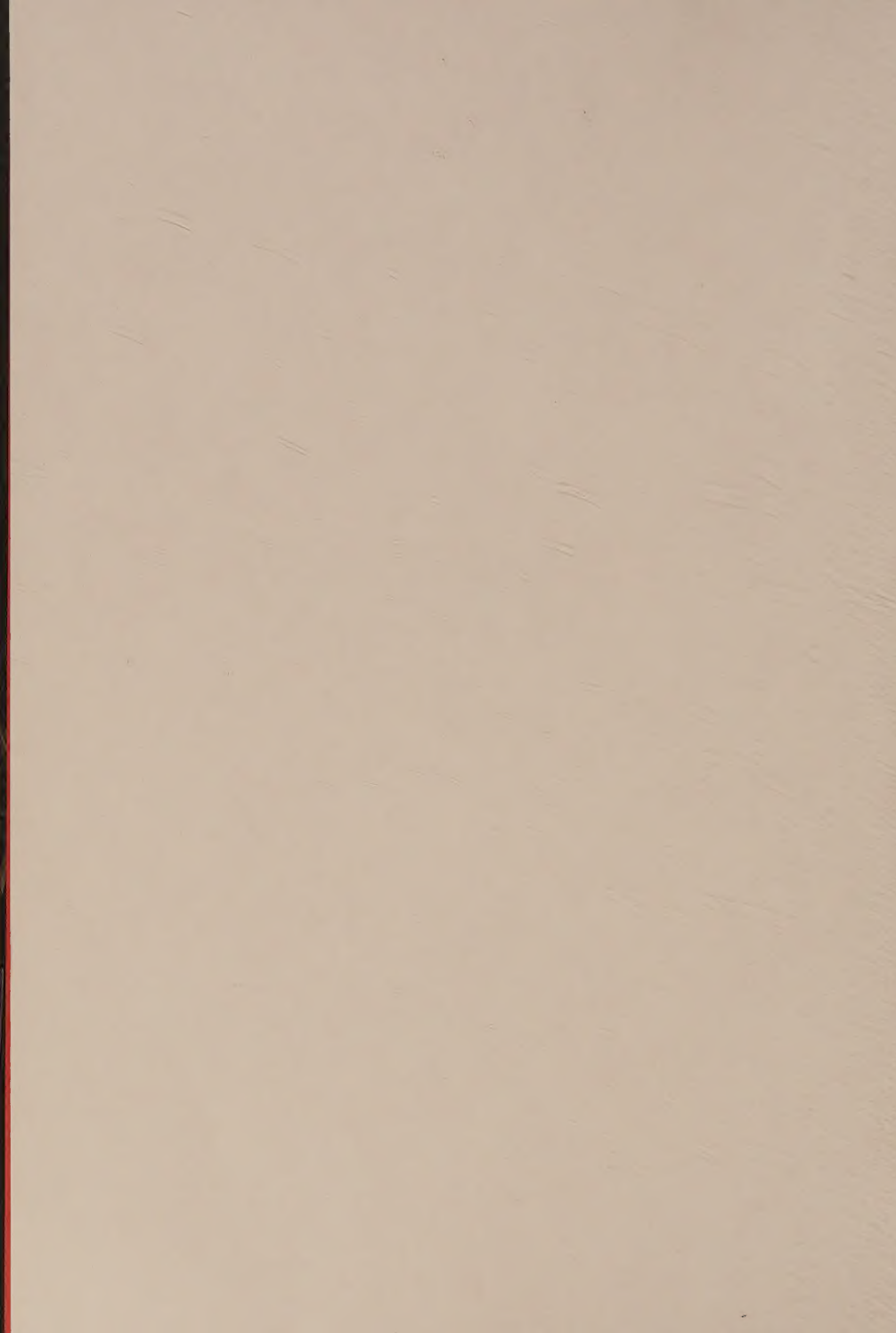


**VERBESSERUNG DER METHODIK ZUM
TIERARTSPEZIFISCHEN NACHWEIS VON
DENATURIERTEM TIERISCHEN PROTEIN**

MICHAELA WOLF

1988

Disbui. München
1988



Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität München

Vorstand Prof. Dr. Dr. h. c. W. Spann

eingereicht über das

Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
Lehrstuhl Prof. Dr. Dr. h. c. L. Kotter

VERBESSERUNG DER METHODIK ZUM TIERART-
SPEZIFISCHEN NACHWEIS VON DENATURIERTEM
TIERISCHEN PROTEIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Michaela Wolf
aus
München

München 1988

Gedruckt mit Genenmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: _____ Prof. Dr. M. Rüsse _____

Referent: _____ Prof. Dr. Dr. h. c. L. Kotter _____

Korreferent: _____ Prof. Dr. H. P. Jennissen _____

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

In Dankbarkeit meinen Eltern und allen,
die mir geholfen haben

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AG	Antigen
AGID	Agargel-Immunodiffusion
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Bovines Serumalbumin
DBM	Diazobenzylloxymethyl
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Glu	Glutamin
Gly	Glyzin
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IP	Isoelektrischer Punkt
Leu	Leucin
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegen- ständegesetz
Lys	Lysin
Met	Methionin
PAG	Polyacrylamidgel
PBS	Phosphate Buffered Saline
Phe	Phenylalanin
PO	Peroxidase
Pro	Prolin
RNA	Ribonucleic Acid
SDS	Sodiumdodecyl-sulphate
Ser	Serin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	3
2.1	Begriffsbestimmung für "Fleisch"	3
2.2	Muskelproteine	4
2.2.1	Sarkoplasmatische Proteine	4
2.2.2	Myofibrilläre Proteine	4
2.2.3	Bindegewebsproteine	5
2.3	Denaturierung von Proteinen	7
2.3.1	Physikalische und chemische Einflüsse auf das Muskelgewebe	9
2.3.1.1	Hitzedenaturierung von Muskelproteinen	9
2.3.1.2	Proteinspaltung durch Pepsine	11
2.4	Wirkung einzelner chemischer Stoffe auf Proteine	13
2.4.1	Harnstoff	13
2.4.1	SDS	14
2.5	Nachweisverfahren für tierische Proteine	15
2.5.1	Physikalisch-chemische Methoden	15
2.5.1.1	Elektrophorese	15
2.5.1.1.1	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	16
2.5.1.1.2	SDS-Elektrophorese	16
2.5.1.2	Isoelektrische Fokussierung	18
2.5.2	Serologische Methoden	20
2.5.2.1	Präzipitation	20
2.5.2.1.1	Ringtest	20
2.5.2.1.2	Agar-Immunodiffusion	21
2.5.2.1.3	Immunelektrophorese	21
2.5.2.1.4	Hämagglutination	22
2.5.2.2	Immunfluoreszenz	23
2.5.3	Blotting	24
2.5.3.1	Spezifische Nachweismethoden	30
2.5.3.2	Dot-Blotting	34

2.6	Affinitätschromatographie	35
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	38
3.1	Chemikalien und Geräte	38
3.2	Probenmaterial	40
3.2.1	Untersuchte Proben	40
3.2.2	Gewinnung der Proben	43
3.2.2.1	Standardproben	43
3.2.2.2	Küchenmäßig zubereitete Proben und Konserven	43
3.2.2.3	Emetogen gewonnene Proben	43
3.2.2.4	Proben aus dem Mageninhalt Verstor- bener	43
3.3	Methoden	44
3.3.1	Proteinextraktion mit Harnstoff	44
3.3.1.1	Lösungen	44
3.3.1.2	Durchführung der Probenextraktion	44
3.3.2	Herstellung der Antiseren	45
3.3.2.1	Lösungen	45
3.3.2.2	Durchführung der Immunisierung	46
3.3.3	Affinitätschromatographie	47
3.3.3.1	Gießen der Antigen-gekoppelten Sepharosesäulen	47
3.3.3.2	Puffer für die Reinigung der Antiseren	47
3.3.3.3	Entfernung der kreuzreagierenden Anti- körper	48
3.3.3.4	Einengung der gereinigten Antiseren	49
3.3.4	SDS-PAG-Elektrophorese	50
3.3.4.1	Lösungen und Puffer	50
3.3.4.2	Gießen eines linearen Gradienten- gels	51
3.3.4.3	Elektrophoretische Auftrennung der Proteine	53
3.3.5	Elektroblotting	54
3.3.5.1	Lösungen und Puffer	54

3.3.5.2	Durchführung des Blottings	54
3.3.5.3	Anfärben der Nitrozellulose	56
3.3.5.4	Dot-Blotting	56
3.3.6	Immunfärbung mit alkalischer Phosphatase	56
3.3.6.1	Lösungen	56
3.3.6.2	Färbemethode	57
3.3.7	Immunfärbung mit Meerrettichperoxidase	58
3.3.7.1	Lösungen	58
3.3.7.2	Färbemethode	59
3.3.8	Quantitative Proteinbestimmung nach LOWRY	60
3.3.8.1	Lösungen	60
3.3.8.2	Durchführung der Proteinbestimmung	61
3.4	Ergebnisse	62
3.4.1	Immunfärbung mit ungereinigten Antiseren	62
3.4.2	Immunfärbung mit gereinigten Antiseren	66
3.4.3	Tierartspezifität der gereinigten Antiseren	70
3.4.4	Identifizierbarkeit hoch erhitzter Proben	75
3.4.5	Proben aus dem Mageninhalt Lebender	82
3.4.6	Proben aus dem Mageninhalt Verstorbener	84
4	DISKUSSION	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	SUMMARY	95
7	LITERATURVERZEICHNIS	97

Einleitung

Aus verschiedenen Gründen besteht Interesse, auch bei hitzedenaturiertem Fleisch die Tierart zu ermitteln. Im Rahmen des Verbraucherschutzes geht es darum, in Fleisch-Erzeugnissen Fleisch von Tierarten nachzuweisen, das in diesen nicht erwartet wird.

Bevorzugt geht es um die Erfüllung von Wertvorstellungen. Es gibt jedoch auch religiöse Gründe (Ausschluß von Schweinefleisch für Juden und Moslems). Möglicherweise kommen dazu noch medizinische Aspekte.

In der Rechtsmedizin und in der Kriminalistik besteht Interesse, Fleisch aus dem Mageninhalt von Menschen einer Tierart zuzuordnen und so z. B. die zuletzt eingenommene Mahlzeit rekonstruieren zu können. Im Magen erfolgt weitgehende Verdauung des Fleischproteins, die eine elektrophoretische Differenzierung erschwert oder ausschließt.

Bei rohem, unbehandeltem Fleisch bereitet die Speziesidentifizierung keine besonderen Schwierigkeiten, zumal früher käufliche Antiseren zur Verfügung standen.

Problematisch ist der Nachweis der Tierart bei erhitztem Fleisch. Bereits UHLENHUTH (1901) bemerkte, daß seine Kaninchenantiseren gegen Fleisch verschiedener Tierarten bei Erhitzung des Fleisches versagten. Trotz intensiver Forschung gelang es bislang nicht, hier zu einem voll befriedigenden Ergebnis zu gelangen.



In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe von Elektrophorese, Elektroblotting und Immunfärbung, also einer Kombination elektrophoretischer und serologischer Methoden, geklärt werden, bis zu welcher Erhitzungstemperatur bei tierischem Protein die Tierart noch ermittelt werden kann.

2

Literatur

2.1

Begriffsbestimmung für "Fleisch"

Gemäß § 4 (1), Nr. 4 des Fleischhygienegesetzes vom 24. 2. 1987 sind "Fleisch" im Sinne dieses Gesetzes alle Teile der in § 1 aufgeführten Tiere, frisch oder zubereitet, die zum Genuß für den Menschen geeignet sind.

In § 2 (1), Nr. 3 des Geflügelfleischhygienegesetzes vom 15. 7. 1982 sind Geflügelfleisch im Sinne dieses Gesetzes alle Teile des in § 1 genannten Schlachtgeflügels, frisch oder zubereitet, die zum Genuß für den Menschen geeignet sind.

Diese Definitionen beinhalten neben dem Muskelfleisch auch Innereien sowie bei Warmblütern Nebenprodukte wie Blut, Blutplasma, Blutserum etc. und gelten nur für den Bereich der amtlichen Fleischuntersuchung. Nach den Leitsätzen des Deutschen Lebensmittelbuches gilt bei der gewerbsmäßigen Herstellung von Fleisch-Erzeugnissen für das Inverkehrbringen von unbehandeltem Fleisch als "Fleisch" einschränkend nur "Skelettmuskulatur mit anhaftendem oder eingelagertem Fett- und Bindegewebe sowie eingelagerten Lymphknoten, Nerven, Gefäßen und Schweinespeicheldrüsen". Diese Definition deckt sich auch mit der allgemeinen Auffassung des Verbrauchers, weshalb im folgenden der Begriff "Fleisch" für Muskelfleisch verwendet wird.

In den "Leitsätzen für Fische, Schalen-, Krusten- und Weichtiere und Erzeugnisse daraus" des Deutschen Lebensmittelbuches wird der Ausdruck "Fischfleisch" für Muskelgewebe von Fischen gebraucht.

2.2 Muskelproteine

Die Muskelproteine werden in 3 Gruppen unterteilt:

Sarkoplasmatische Proteine

Myofibrilläre Proteine

Bindegewebsproteine

2.2.1 Sarkoplasmatische Proteine

Die sarkoplasmatischen Proteine machen ca. 30 % der gesamten Muskelproteine aus.

Versetzt man homogenisiertes Muskelfleisch mit Salzlösungen niedriger Ionenstärke, so erhält man nach Zentrifugation das Sarkoplasma im Überstand. Bei den Sarkoplasmaproteinen handelt es sich um globuläre Proteine oder Sphäroproteine, die in echte globuläre Proteine und Albumine unterteilt werden.

Echte globuläre Proteine sind nur in verdünnten Neutralsalzlösungen löslich, während Albumine sich auch in reinem Wasser lösen (SCHEUNERT und TRAUTMANN, 1987).

2.2.2 Myofibrilläre Proteine

Myofibrilläre Proteine bestehen aus Myosin, Aktin, Tropomyosin und Troponin.

Myosin, das ca. 35 % der gesamten Muskelproteine ausmacht, besteht aus zwei langen Polypeptidketten und hat ein Molekulargewicht von 500.000. Es setzt sich aus dem schweren Meromyosin (HMM) und dem leichten Meromyosin (LMM) zusammen und weist einen hohen Anteil an Aspartat und Glutamat sowie Aminosäuren mit basischen Gruppen wie Histidin, Lysin und Arginin auf. Unter physiologischen Bedingungen

ist das Molekül negativ geladen, sein isoelektrischer Punkt liegt bei 5,4.

Aktin, das ca. 15 % der gesamten Muskelproteine ausmacht, ist ein globuläres Protein.

Bei dem im Muskel vorkommenden Aktin handelt es sich um F-Aktin, das aus vielen Untereinheiten aufgebaut ist. Diese Untereinheiten sind G-Aktinmoleküle mit einem Molekulargewicht von 46.000, die unter dem Einfluß neutraler Salze unter ATP-Spaltung zu F-Aktin polymerisieren (KARLSON, 1980).

Tropomyosin mit einem Molekulargewicht von 70.000 ist ein langgestrecktes Molekül, das leicht polymere Fibrillen bildet.

Troponin, das ein Molekulargewicht von 60.000 hat, weist eine dem Myosin ähnliche Aminosäuren-Sequenz auf (KARLSUN, 1980).

2.2.3 Bindegewebsproteine

Kollagen und Elastin sind Bindegewebsproteine.

Kollagen ist mengenmäßig das wichtigste Bindegewebsprotein und weist einen hohen Hydroxyprolingehalt von ca. 12,8 % auf. Es ist aus einer starren Tripelhelix aufgebaut, bei der jede dritte Aminosäure Glyzin ist.

Bei Erhitzung auf 70 °C verkürzt sich die kollagene Faser auf ein Drittel ihrer ursprünglichen Länge. Ab 80 °C erfolgt eine Umwandlung in Gelatine, die beim Abkühlen steife Gallerten bildet.

Elastin kommt auf Grund der besonderen Vernetzung seiner Peptidketten in Form von gummi-elastischen Fasern vor. Mit fortschreitendem Alter der Tiere werden Lysinreste zu Aldehydgruppen oxidiert und kondensieren zu einem substituierten Pyridinring. Elastin enthält zu 95 % hydrophobe Aminosäuren wie Glyzin, Prolin und Leucin. Es wird durch Hitze nicht denaturiert und ist extrem säure- und basenresistent (KARLSON, 1980).

2.3 Denaturierung von Proteinen

Trotz zahlreicher Definitionsversuche existiert auch heute noch keine einheitliche Definition des Begriffes "Proteindenaturierung".

So versteht NEURATH (1944) darunter jede nicht proteolytische Modifikation der ursprünglichen Struktur nativer Proteine, die chemische, physikalische und biologische Eigenschaften irreversibel verändert.

Für PUTNAM (1948) ist die Denaturierung eine ausschließlich für Proteine charakteristische Eigenschaft. Er sieht darin eher eine physikalische oder intramolekulare Umstrukturierung als eine chemische Änderung der nativen Proteinstruktur. Sie führe zu einer Änderung der spezifischen räumlichen Struktur.

Eine andere Definition stammt von KAUZMANN (1956), der unter Denaturierung jeden Prozeß versteht, der die Sekundär- oder Tertiärstruktur eines Polymers verändert oder zerstört.

COLVIN (1964) hält den Begriff "Denaturierung" in der Proteinchemie für nicht sinnvoll, sondern befürwortet statt dessen eine genaue Beschreibung der dabei ablaufenden chemischen Prozesse.

Nach KARLSON (1980) handelt es sich bei der Denaturierung eines Proteins um eine Strukturänderung, bei der biologische Eigenschaften wie enzymatische oder hormonelle Wirkungen verlorengehen. Chemische und physikalische Eigenschaften werden verändert, die Löslichkeit werde verringert und das Kristallisationsvermögen gehe verloren. Es handele sich um den Übergang von einem hochgeordneten in einen un-

geordneten Zustand, das sog. Zufallsknäuel (eng.: random coil), was gleichbedeutend mit einer Zunahme der Entropie sei.

Chemisch entspreche diese Veränderung der Lösung von Nebenvalenzen, die zuvor das globuläre Protein in der nativen Konformation stabilisierten. Daraus resultiere eine Entfaltung der Proteinketten und eine rein statistische Ausbildung von Nebenvalenzen zwischen den Ketten. Hierdurch werde das Protein unlöslich. Bei diesen Umlagerungen werden auch besonders reaktionsfähige Gruppen aus dem Innern der Moleküle an die Oberfläche verlagert (z. B. Sulfhydrylgruppen oder Tyrosinreste). Denaturierte Proteine werden von Proteasen wesentlich leichter angegriffen als native. Die Denaturierung eines Proteins könne durch physikalische und chemische Einflüsse ausgelöst werden. Als physikalische Faktoren seien Hitze- und Strahleneinwirkung zu nennen.

Chemische Einflußfaktoren seien Säuren, Basen, organische Lösungsmittel, konzentrierte Harnstoff- oder Guanidinlösungen und Detergentien wie Dodecylsulfat.

Die einzelnen Proteine seien gegenüber derartigen Einflüssen unterschiedlich empfindlich.

Im Gegensatz zu früher, als man die Denaturierung von Proteinen für einen irreversiblen Prozeß hielt, sei heute bekannt, daß in manchen Fällen eine Renaturierung des Proteins möglich ist, da ja die Aminosäuren-Sequenz unverändert bleibe (KARLSON, 1980).

2.3.1 Physikalische und chemische Einflüsse auf das Muskelgewebe

Fleisch wird meist nicht roh verzehrt, sondern vor dem Verzehr verschiedenen physikalischen bzw. chemischen Prozessen unterworfen.

Bestimmte Prozesse laufen bei der Fleischreifung durch enzymatische Vorgänge ab.

Je nach dem Zeitpunkt der Verarbeitung liegen daher bereits im rohen Fleisch unterschiedliche Verhältnisse vor. Man unterscheidet hierbei die Prärigor-, die Rigor- und die Postrigorphase (BENDALL, 1973).

Beim Einfrieren und Auftauen zerplatzen teilweise die Zellwände, Zellstrukturen werden zerstört (LUYET, 1966).

Bei Be- und Verarbeitung wird Fleisch zum Teil auch verschiedenen Behandlungsverfahren unterzogen (z. B. Pökellung, Räucherung, Trocknung, Erhitzung) (TRAUTMANN, 1966).

Am nachhaltigsten wird die Proteinstruktur durch die Denaturierung beeinflusst.

2.3.1.1 Hitzenaturierung von Muskelproteinen

Der Grad der Proteindenaturierung ist von der Höhe der einwirkenden Temperatur und der Dauer der Hitzeeinwirkung abhängig.

HAMM (1966) untersuchte die Veränderungen an Muskelproteinen bei der Einwirkung von unterschiedlich hohen Temperaturen. Bereits bei 20 bis 30 °C vermindert sich bei isolierten Muskelproteinen die ATP-ase-Aktivität. An Myosinmolekülen kommt es sogar schon bei diesen Temperaturen zu

geringen Veränderungen (ENGELHARDT, 1946; HASHIMOTO et al., 1959; NANNINGA, 1962).

Daß an Muskelproteinen im Muskelgewebsverband erst zwischen 40 und 60 °C Veränderungen festgestellt werden können, ist nach HAMM (1966) auf den protektiven Effekt der Proteine im umgebenden Gewebe, die hohe Proteinkonzentration im Gewebe und die spezielle sterische Anordnung der Proteine zurückzuführen.

Diese Veränderungen zeigen sich in Form von verminderter Kationen- und Wasserbindungskapazität, Abnahme der Löslichkeit, Veränderungen des pH und des isoelektrischen Punktes (IP), was auf zusätzlich verfügbaren Imidazolgruppen beruht. Eine Erhitzung auf mehr als 50 °C führt zu stabilen Vernetzungen im Protein, die beständig gegen schwache Basen und Säuren sind. Als Ursache wird die Entstehung neuer Wasserstoffbrücken, zusätzliche Disulfidbrücken und die Bildung unpolarer Seitenketten vermutet (HAMM, 1966; HEIMANN, 1976).

Die eigentliche Denaturierung ist dadurch gekennzeichnet, daß das Protein am isoelektrischen Punkt unlöslich wird. Davon zu unterscheiden ist die Koagulation, die zusammen mit der Beständigkeit und Viskosität eines Proteins am isoelektrischen Punkt ihr Maximum hat (SCHORMÜLLER, 1974). Die Disulfidbindung, resultierend aus zwei Cystein-Sulphydrylgruppen, stellt in der Helix die wichtigste Hauptvalenzbindung dar (BELITZ und GROSCH, 1982). Bei jedem Protein sind dabei als Charakteristikum jeweils bestimmte Cysteinreste miteinander verbunden. Bis 70 °C erfolgt in steigendem Maße eine Demaskierung der Sulphydrylgruppen durch Auffaltung der Proteine, die über 70 °C abgeschlossen zu sein scheint.

Die Demaskierung der Sulfhydrylgruppen ist zwischen 40 und 60 °C nicht von der Bildung neuer Disulfidbindungen begleitet, da die Oxidation der SH-Gruppen erst ab 70 °C eintritt. Bei Temperaturen über 80 °C bildet sich aus den SH-Gruppen des Aktomyosins in zunehmendem Maße H_2S . Nach HAMM (1966) entsteht H_2S fast ausschließlich aus Strukturproteinen der Myofibrillen und nicht aus wasserlöslichen Sarkoplasmaproteinen.

Ab 40 °C kommt es zum Ausstrom von zuvor protein-gebundenen Kationen (Mg^{++} und Ca^{++}), der sein Maximum bei einer Temperatur von mehr als 90 °C hat. Durch den Ausstrom von freiem Orthophosphat (PO_4^{---}) zwischen 90 und 120 °C sinkt der Phosphatgehalt des koagulierten Proteins erheblich ab. Eine Inaktivierung der intramuskulären Proteasen und Phosphatasen erfolgt bei 70 °C. Sehr stabil ist die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), von der selbst bei 80 °C noch Aktivität nachgewiesen werden kann (HAMM, 1966).

2.3.1.2 Proteinspaltung durch Pepsine

Pepsin ist der Hauptkatalysator der Magenverdauung bei Säugern und Vögeln. Es läßt sich aus der Magenmucosa isolieren. Pepsine sind gastrische Proteasen, die bei saurem pH-Wert aktiv sind und durch spezielle Proteolyse aus inaktiven Vorstufen, nämlich Pepsinogen entstehen. Im menschlichen Magensaft sind ca. 400 mg Pepsin/l enthalten. Neben dem eigentlichen Pepsin, das auch als Pepsin A bezeichnet wird, existiert ein weiteres proteolytisches Enzym, das Pepsin C. Hiervon enthält der menschliche Magensaft ca. 150 mg/l (FRUTON, 1971).

Die Pepsine der verschiedenen Tierarten unterscheiden sich in ihren Aminosäuren-Sequenzen nur unerheblich. Die optimale Wirkung entfaltet Pepsin A bei einem pH zwischen 3 und 3,5. Beim Menschen erreicht der Magensaft bei maximaler Salzsäuresekretion einen pH-Wert von 1. Bei Zutritt des Speisebreies erfolgt ein Anstieg auf pH 2 bis 4 .

Die spezifische Wirkung der Pepsine bezieht sich auf Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten (Phe, Tyr, Leu, Met). Nach FRUTON (1971) sind jedoch auch weniger spezifische Proteolysen zwischen Ser-Thr-, Glu-Lys-, Asp-Pro-, Ala-Gly- und anderen Bindungen möglich.

Neben Pepsin sezerniert die Magenschleimhaut auch Wasser, Elektrolyte, Muzin, Salzsäure und in geringem Maße Lipase. Dies bedeutet, daß die Proteinverdauung nicht erst im Dünndarm einsetzt, sondern bereits im Magen beginnt (FRUTON, 1971; MAGEE und DALLEY, 1986). Die Salzsäure des Magensaftes sorgt für einen optimalen pH-Wert für das Pepsin und löst in der Nahrung enthaltene, unlösliche Salze (TRÜGER et al., 1987). DAVENPORT (1982) und MAGEE (1974) schränken die Bedeutung der Proteinverdauung im Magen ein, da ihrer Meinung nach im Magen Gesunder in Abhängigkeit von Sekretionsmenge, Größe der aufgenommenen Partikel und Magenmotilität nur ein geringer Anteil (etwa 10 bis 15 %) der Proteine gespalten wird. Im Mageninhalt sind von den intakten Proteinen bis zu den Aminosäuren alle Abbaustufen der Proteinverdauung anzutreffen.

Beim Mageninhalt Verstorbener liegen andere Verhältnisse vor. So ist nach MERKEL (1922) eine weitere Passage im Magen-Darm-Trakt in größerem Umfang nicht gegeben, die aufgenommenen Proteine verbleiben also

nach dem Todeseintritt noch im Magensaft. Dies hat eine gründlichere Denaturierung des Materials zur Folge als beim Mageninhalt Lebender. So können aus dem Mageninhalt Verstorbener zwar häufig makroskopisch intakte Fleischbrocken entnommen werden, auf Grund der Aspektion läßt sich aber nicht mit letzter Sicherheit klären, von welcher Tierart das Fleisch stammt.

2.4 Wirkung einzelner chemischer Stoffe auf Proteine

2.4.1 Harnstoff

Bei der Hitzeeinwirkung auf Proteine kommt es nicht nur zur oben aufgeführten Denaturierung. Parallel dazu verläuft die sog. Wärmeaggregation, die mit einer Erhöhung des Partikelgewichts einhergeht. Zurückzuführen ist diese Aggregation auf intermolekulare Bildung von Wasserstoff- und Disulfidbrücken durch zuvor intramolekular abgesättigte Nebenvalenzen (SINELL und MENTZ, 1969). Nach JAENICKE (1965) entspricht die Aggregation einer gekoppelten Koagulations- und SH-SS-Austauschreaktion. Wärmeaggregation und -denaturierung können sich überlagern, müssen es aber nicht (SINELL und MENTZ, 1969).

Die Wirkung von Harnstoff auf das Eiweißmolekül ist der Wärmeaggregation entgegengesetzt. Bei Einwirkung auf aggregierte Proteine kommt es zu einer Dissoziation (JAENICKE, 1965).

Auch bei hitzekoagulierten Sarkoplasmaproteinen wäre es vorstellbar, daß durch die Einwirkung von Harnstoff "in immunchemischer Hinsicht determinante Struktureinheiten desaggregiert werden und damit ihre Reaktionsfähigkeit wieder erlangen" (SINELL und MENTZ, 1969). Daneben hat Harnstoff auch einen de-

naturierenden Effekt auf Proteine, der aber einen negativen Temperaturkoeffizienten aufweist, das heißt bei hohen Temperaturen schwächer ist als bei niedrigen (HAUROWITZ, 1960).

Die Proteinextraktion mit Harnstoff ist eine in der Lebensmittelanalytik seit langem bewährte Methode (SINELL und MENTZ, 1969; HELLMANNSBERGER, 1981; MANZ, 1983; ROIDER, 1984; DAUM, 1984).

2.4.2 SDS

Bei Natriumdodecyl-sulfat (Natriumlauryl-sulfat, Sodiumdodecyl-sulphate = SDS) handelt es sich um ein anionisches Detergens, das fast alle nichtkovalenten Bindungen am nativen Protein aufspaltet. Durch die Bindung von SDS werden die meisten Proteine in ihre Untereinheiten dissoziiert, was zur Bildung von denaturierten Polypeptidketten führt.

Die Alkylreste der SDS-Anionen binden an die hydrophoben Regionen eines Proteins in einem Verhältnis von einem Molekül SDS auf zwei Aminosäurereste, was eine stark negative Ladung bewirkt, die gewöhnlich die vorherige Ladung des nativen Proteins bei weitem übersteigt, weshalb diese daher vernachlässigt werden kann.

Mit SDS behandelte Moleküle verhalten sich bei der Elektrophorese, als hätten sie eine einheitliche Gestalt und ein identisches Verhältnis von Ladung zu Masse (COOPER, 1981; FREIFELDER, 1976; STRYER, 1988).

2.5 Nachweisverfahren für tierische Proteine

2.5.1 Physikalisch-chemische Methoden

2.5.1.1 Elektrophorese

Elektrophorese ist definiert als ein Vorgang, bei dem es auf Grund eines elektrischen Feldes (Potentialgefälle) in einem viskösen Medium (Gel oder Flüssigkeit) zur Wanderung geladener Teilchen kommt (MAURER, 1971). Dabei spielen Größe, Molekulargewicht, Gestalt, Konzentration, elektrische Ladung, Hydratation und Dissoziationsgrad der Teilchen eine Rolle. Beim Medium, in dem das Teilchen wandert, sind die Viskosität, der pH-Wert, und die Temperatur entscheidend.

Als äußere Faktoren kommen noch Stärke des elektrischen Feldes, Länge der Trennstrecke und Dauer der Elektrophoresezeit hinzu.

Die pH-Abhängigkeit erklärt sich aus dem amphoteren Charakter der Proteine. So erfolgt die Wanderung der Proteine bei Protonenüberschuß, also im sauren Milieu als Kationen, im alkalischen Milieu als Anionen. Somit hängt die Wanderungsrichtung vom pH-Wert des Mediums ab (BLIX et al., 1965).

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Nettoladung, die die einwirkende elektrische Kraft bestimmt sowie von der Größe und Gestalt der Moleküle, die die Reibungskraft ausmachen (KARLSON, 1980).

2.5.1.1.1 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Das Medium besteht hier aus einem Polyacrylamidgel. Durch Zugabe eines Vernetzers ("Crosslinker"), gewöhnlich N,N'-Methylenbisacrylamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) wird das Monomer Acrylamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) zu Polyacrylamid polymerisiert. Durch Vernetzen der Polyacrylamidketten, die sich aneinanderlegen, entsteht ein dreidimensionales Maschenwerk. Das Polyacrylamidgel ist transparent und je nach Polyacrylamidkonzentration mehr oder weniger elastisch. Es besitzt keine polaren Gruppen, so daß elektroosmotische und adsorptive Effekte vermieden werden (SCHRÜTER, 1985). Die Porengröße und somit der Molekularsiebeffekt des Gels wird durch die Konzentration des Acrylamids und den Vernetzungsgrad bestimmt. Der Reibungswiderstand, der auf die Moleküle während des Elektrophoresevorganges einwirkt, schränkt ihre Diffusion ein. Dadurch sind die einzelnen Banden der getrennten Fraktionen schärfer und besser zu unterscheiden (WESTERMEIER et al., 1982).

2.5.1.1.2 SDS-Elektrophorese

Die Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulphate = SDS) wird in der Literatur 1967 von SHAPIRO et al. erstmals beschrieben.

SDS bewirkt bei Proteinen eine Auffaltung des Moleküls und eine Streckung der einzelnen Polypeptidketten.

Auf diese Weise wird die Molekulargewichtsbestimmung auch bei Proteinen unterschiedlicher Molekülformen ermöglicht.

SDS gehört zu den anionischen Detergentien, weshalb das Proteinmolekül pro gebundenes SDS-Molekül eine negative Ladungseinheit erhält. Bei pH 7 entspricht die Nettoladung des SDS-Protein-Komplexes der Ladung der SDS-Moleküle (OHLENSCHLÄGER et al., 1980; PUTNAM, 1948; GLAZER et al., 1975).

Mit Ausnahme von Glyko- und Lipoproteinen haben alle aufgefalteten SDS-Proteinkomplexe eine einheitliche Ladungsdichte. Die Trennung erfolgt bei der SDS-Elektrophorese nach dem Reibungswiderstand, deshalb ist die Laufstrecke der Moleküle dem Molekulargewicht proportional (PETERS et al., 1985).

In der Lebensmittelanalytik wurde diese Methode zunächst für den Nachweis von nativem tierischen Protein (TAO, 1985; PARISI und AGUIARI, 1985; VIZZANI et al., 1985; HOFMANN und BLÜCHEL, 1986) oder den Nachweis von Fremdproteinen in Fleischbräten verwendet (HOFMANN und PENNY, 1973); anschließend wurde auch der Einfluß von Hitze auf Fleischproteine (HOFMANN, 1977) und Fischproteine (MOUSTAFA et al., 1982) dargestellt; außerdem wurden Schlachttierorgane auf Grund ihrer Bandenmuster identifiziert.

SCHRÜTER (1985) konnte bei hitzedenaturiertem Fleisch aus dem Mageninhalt Verstorbener zwar auf Grund des Bandenmusters Säugetier- von Vogelfleisch abgrenzen, eine weitere Differenzierung innerhalb der Säuger war jedoch nicht möglich.

2.5.1.2 Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) werden die Proteine auf Grund ihres unterschiedlichen isoelektrischen Punktes getrennt. Dabei sind keine denaturierenden Detergentien notwendig. Die Auftrennung erfolgt wie bei der Elektrophorese auf einem Gel. Durch den Stromfluß während der Auftrennung kommt es zu einer kontinuierlichen Anreicherung von H_3O^+ - und OH^- -Ionen an den Elektroden, das heißt im Anodenbereich verringert und im Kathodenbereich erhöht sich der pH-Wert, wodurch es zu einem pH-Gradienten zwischen den Elektroden kommt (SVENSSON, 1961; VESTERBERG, 1969).

Dieser pH-Gradient kann durch Ampholyte, sogenannte Trägerampholine stabilisiert werden.

Das aufzutrennende Proteingemisch wandert entsprechend seiner Ladung bis zum isoelektrischen Punkt der einzelnen Proteine, an dem diese liegenbleiben. Je nach Probe muß ein geeigneter pH-Gradient gewählt werden, um eine möglichst deutliche Auftrennung der Proteine zu erhalten. Auf Grund der feineren Auftrennung erhält man bei der IEF dreimal mehr Banden als bei der SDS-PAGE-Elektrophorese (HOFMANN, 1985). KING (1984) zeigte, daß in bestimmten Fällen die Enzyme Kreatinkinase bis 105 °C, Adenylatkinase noch bis 120 °C in erhitztem Fleisch als relativ tierartspezifische Banden nachgewiesen werden können. Verschiedene Autoren beschreiben den tierart-spezifischen Nachweis von nativem Säugetierfleisch (PARISI und AGUIARI, 1985; Grundhöfer, 1985) bzw. Fischfleisch (MOUSTAFA et al., 1982) mit IEF. KAISER et al. (1980, 1982) konnten bei rohem Brät sowohl

Tierart- als auch Organspezifität selbst in Gegenwart von Salz, Speck und Gewürzen nachweisen.

Mit einer Modifizierung der IEF gelang BAUER und HOFMANN (1987) eine Tierartidentifizierung bei bis auf 100 °C erhitztem Fleisch auf Grund der unterschiedlichen Myoglobinmuster.

2.5.2 Serologische Methoden

Die in der Lebensmittelanalytik angewandten serologischen Methoden für die Tierartbestimmung bei Fleisch beruhen auf der Reaktion spezifischer Antikörper (AK) mit dem Antigen (AG).

Der Erfolg serologischer Testmethoden hängt dabei entscheidend von der Qualität der verwendeten Antiseren ab. Die käuflichen Antiseren sind nur gegen rohes Fleisch gerichtet.

Für höher erhitztes Fleisch müssen Antiseren selbst hergestellt werden, indem man mit Extrakten aus erhitztem Fleisch Versuchstiere immunisiert.

2.5.2.1 Präzipitation

2.5.2.1.1 Ringtest

Der Ringtest ist die einfachste Form, in der die Präzipitin-Reaktion durchgeführt werden kann. Dabei wird spezifisches Antiserum vorsichtig mit flüssigem Antigen überschichtet.

Es wird zwischen dem α -Verfahren, bei dem die AK-Konzentration konstant ist und die AG-Konzentration variiert, und dem β -Verfahren, bei dem die AK-Konzentration variiert und die AG-Konzentration konstant ist, unterschieden.

Es erfolgt eine gegenseitige Diffusion. Bei einer Bindung von Antigen und Antikörpern bildet sich eine weiße Präzipitatscheibe an der Berührungsebene beider Flüssigkeiten.

Vorteilhaft ist der geringe apparative Aufwand und die rasche Durchführbarkeit dieser Methode.

2.5.2.1.2 Agargel-Immunodiffusion

Bei der Agargel-Immunodiffusion (AGID) (OUCHTERLONY, 1958) handelt es sich um eine Abwandlung des Ringtests.

Dabei dient Agargel als Reaktionsmedium, in dem AG und AK gegeneinander diffundieren.

Bei der einfachsten Technik, der einfachen Diffusion, wird das Antiserum in den Agar eingebettet und mit Antigenlösung überschichtet.

Diese Technik wurde von OUCHTERLONY (1962) modifiziert. AG und AK werden in eingestanzte Löcher im Agar gefüllt und können so im Sinne einer Doppeldiffusion aufeinander zu diffundieren. Im Falle einer positiven Reaktion kommt es zu einer Trübung des klaren Agars, die durch anschließende Färbung noch verdeutlicht werden kann. Der Agargel-Immunodiffusionstest nach OUCHTERLONY (1962) ist auf Grund der einfachen Handhabung zu einem Routinetest in der Lebensmittelanalytik geworden (vgl. Amtliche Sammlung der Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG).

Eine modifizierte Methode, bei der mit Fleischsaft und mit Antiserum getränkte Papierscheiben über Nacht auf den Agar gelegt werden, beschreibt JOHNSTON (1985), der damit routinemäßig Beimengungen anderer Fleischarten in rohem Rindfleisch nachwies.

2.5.2.1.3 Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese stellt die Kombination eines physikalisch-chemischen und eines immunchemischen Verfahrens dar und wurde von GRABAR und WILLIAMS (1953) entwickelt (DAUM, 1984).

Das Antigen wandert im Agargel zunächst in einem elektrischen Feld und wird elektrophoretisch aufgetrennt. Quer zur elektrophoretischen Wanderungsachse befindet sich eine in den Agar gestanzte Rinne, die mit Antiserum gefüllt ist. Nach der elektrophoretischen Auftrennung des Antigens diffundieren AG und AK aufeinander zu und bilden deutlich sichtbare Präzipitate, die durch Anfärbung verdeutlicht werden können.

Die Immunelektrophorese wurde in der Lebensmittelanalytik sowohl beim Nachweis der tierartlichen Herkunft von rohem (SWART und WILKS, 1982; HVASS, 1985; DOBERSTEIN und GREUEL, 1985; COOPER, 1985) als auch von erhitztem Fleisch (MILGROM und WITEBSKY, 1962; MILGROM et al., 1963; SHULMAN et al., 1964; MILGROM et al., 1964; HAYDEN, 1981; KANG'ETHE et al., 1985) häufig angewandt. SINELL und MENTZ (1969) beschreiben die Immunelektrophorese als bestes serologisches Verfahren für den tierartlichen Nachweis von Extrakt aus erhitztem Fleisch.

2.5.2.1.4 Hämagglutination

Es wird unterschieden zwischen der direkten und der indirekten Hämagglutination.

Bei der direkten Hämagglutination erfolgt eine Agglutination von Erythrozyten durch die direkte Einwirkung von Antikörpern.

Bei der indirekten Hämagglutination wird das Antigen zuerst an die Erythrozytenoberfläche adsorptiv gebunden und dann mit dem Antikörper reagieren gelassen.

Durch die Bindung an Erythrozyten wird die AG-AK-Komplexbildung sichtbar gemacht.

2.5.2.2 Immunfluoreszenz

Bei diesem von COONS und KAPLAN (1950) entwickelten Test werden die Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Wirken diese Antikörper auf einen histologischen Schnitt des Probenmaterials und erfolgt eine Bindung an das Antigen, so lassen sich die AG-AK-Komplexe fluoreszenzmikroskopisch nachweisen.

2.5.3 Blotting

Die Technik des Blottings ist relativ neu. Erstmals wurde sie 1979 von RENART et al. und TOWBIN et al. beschrieben.

Blotting stellt den Übergang von elektrophoretisch aufgetrennten Molekülen aus dem Elektrophoresegel auf einen immobilisierenden Membranfilter dar.

Im Verhältnis zu anderen Techniken weist das Blotting mehrere Vorteile auf (GERSHONI und PALADE, 1983):

- Die Technik ist einfach durchzuführen.
- Antigene werden für die Antikörper besser zugänglich.
- Für die Nachweisverfahren sind geringere Mengen an Antigen nötig, die Nachweisgrenze für Immunglobulin liegt bei 1 ng (TOWBIN und GORDON, 1984).
- Die Methode ist weniger zeitaufwendig als andere.
- Antigene auf einem Blot können über Monate aufbewahrt werden, bevor sie zum Versuch herangezogen werden.
- Mit einem Blot können mehrere Nachweisverfahren durchgeführt werden.
- Die AG-AK-Komplexe müssen keine Präzipitate bilden, da der Membranfilter immobilisierend wirkt.

Die Entwicklung dieser Technik begann 1975, als SOUTHERN eine Methode zur Übertragung von DNA-Bruchstücken von Agarosegelen auf eine Nitrozellulosemembran durch kapillare Kräfte beschrieb. Nach ihrem Urheber wurde diese Methode als "Southern Blotting" bezeichnet.

Im Gegensatz zum sog. "Southern Blotting" wurde der Transfer von RNA als "Northern Blotting" bezeichnet. RENART et al. (1979) und TOWBIN et al. (1979) führten die Übertragung von Proteinen von Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen durch, das sog. "Western Blotting". Dies stellt die am meisten verbreitete Art des Blottings dar. Nach TOWBIN et al. (1979) binden die meisten Nukleinsäuren und Proteine an Nitrozellulose. Schwierigkeiten treten lediglich auf bei sehr kleinen Molekülen, Salzen sowie einsträngiger DNA und RNA.

Nitrozellulosemembranen sind mikroporöse Membranen mit mittleren Porengrößen zwischen 0,2 und 0,45 μm und großem Hohlraumvolumen. Der genaue Bindungsmechanismus zwischen Nitrozellulose und Proteinen ist noch nicht geklärt, aber es ist vom nicht kovalenten und Überwiegend hydrophoben Charakter der Bindungen auszugehen (GERSHONI und PALADE, 1983).

Die Bindungskapazität von Nitrozellulose liegt zwischen 50 und 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Daneben finden auch andere Membranmaterialien Anwendung. Nylon eignet sich hauptsächlich für das Blotting von Nukleinsäuren und weist eine entschieden höhere Bindungskapazität auf. Leider ist auch die Neigung zu unspezifischen Hintergrundbindungen größer. Modifizierte Zellulose wie DBM-Papier (Diazobenzylloxymethyl-Papier), Cyanbromid-aktiviertes Zelluloseacetat, Cyanurchlorid-aktiviertes Papier etc., finden heute nur noch in Einzelfällen Verwendung.

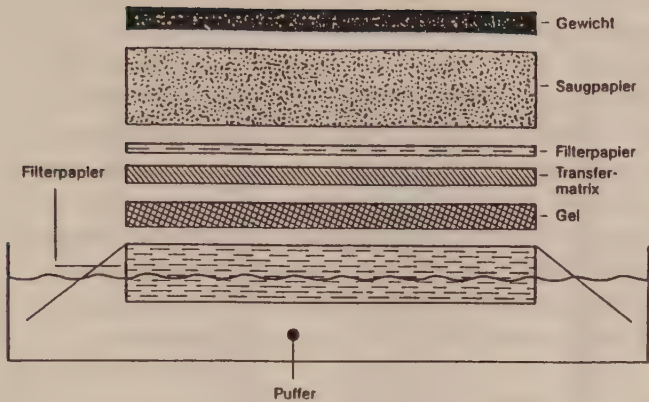
Für das Blotting existieren verschiedene Transfertechniken:

Diffusionsblotting

Es ist die einfachste Methode, die darin besteht, Gel und immobilisierende Membran für längere Zeit in engen Kontakt zu bringen, z. B. unter Belastung mit einem Gewicht. Der Nachteil liegt darin, daß kein quantitativer Transfer erfolgt und kleine Moleküle schneller Übertragen werden als große (ERLICH et al., 1979).

Kapillarblotting

Kapillarblotting findet heute noch seine Anwendung beim Transfer von DNA und RNA aus Agarosegelen. Als treibende Kraft fungiert ein Flüssigkeitsstrom, der aus dem Pufferreservoir durch das Gel und die Bindungsmatrix hindurch in eine dicke Schicht von Saugpapier gerichtet ist und dabei die Banden auf die Membran überträgt (SOUTHERN, 1975). Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der langen Transferzeit und der geringen Eignung für Polyacrylamidgele.



Kapillarblotting nach Southern

Abb. 1: PFISTERER (1987)

Elektroblotting

Elektroblotting ist für den Transfer von Proteinen, DNA und RNA aus Polyacrylamidgelen die Methode der Wahl. Das Gel und die immobilisierende Matrix werden zwischen Filterpapier in einen Plastikrahmen eingespannt und senkrecht in den Puffertank zwischen die Elektroden gehängt.

Richtung und Quantität des Transfers hängen in ähnlicher Weise wie bei der Elektrophorese von Ladung und Größe der Moleküle sowie der Polyacrylamidkonzentration und dem Puffer ab.

Bei SDS-Gelen wird in schwach alkalischen Puffern mit der Membran auf der Anodenseite geblottet, da die Proteine als Anionen transferiert werden.

Bei sauren Harnstoffgelen wird mit Essigsäurepuffern zur Kathode hin geblottet (JOHNSON et al., 1983).

Die Transferpuffer beinhalten zumeist Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) und Glyzin in niedermolarer Konzentration. Über den Einsatz von Methanol, den TOWBIN und GORDON (1984) vorschlagen, herrschen verschiedene Ansichten.

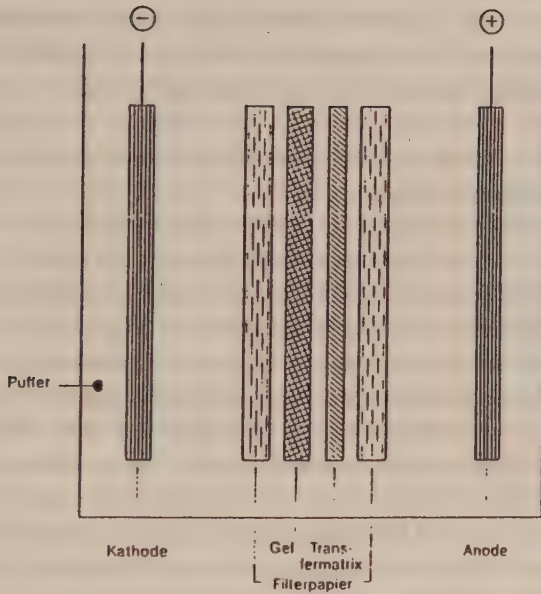
Einerseits wird durch Methanol die Bindungskapazität der Nitrozellulose erhöht (BURNETTE, 1981; GERSHONI und PALADE, 1982; NIELSEN, 1982) und das Anschwellen des Gels vermindert, was weniger verzerrte Banden auf der Membran zur Folge hat. Andererseits verringert sich die Menge an eluiertem Protein bei SDS-Polyacrylamidgelen (GERSHONI und PALADE, 1982; NIELSEN, 1982). Beim Transfer von extrem hochmolekularen Proteinen verlängert sich zudem die Transferzeit (BURNETTE, 1981).

Der Vorteil des Elektrotransfers besteht in der Ermöglichung eines schnellen und quantitativen Transfers.

Von Nachteil sind der hohe Pufferverbrauch und das umständliche Zusammenbauen des Blotting-Sandwichs (siehe Abbildung).

Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Schaffung eines gleichmäßigen und ausreichend hohen elektrischen Feldes, wobei sich Gitter und Elektroden aus Platin sehr gut bewährt haben.

Auf Grund der Hitzeentwicklung durch die hohen Stromstärken muß für eine Wärmeableitung durch ein externes Kühlsystem gesorgt werden (GERSHONI und PALADE, 1983).



Elektroblotting nach Towbin

Abb. 2: PFISTERER (1987)

Ist keine Immulfärbung beabsichtigt, so kann die Nitrozellulosemembran nach dem Blotting mit Amidoschwarz, Fast Green und Königsblauer Tinte (HANCOCK und TSANG, 1983) rasch angefärbt werden.

2.5.3.1 Spezifische Nachweismethoden

Direkt nach dem Transfer erfolgt das sog. "Blocking" oder "Quenching", bei dem alle freien Bindungsstellen der Matrix mit einem unspezifischen und nicht reaktiven Agens blockiert werden. Andernfalls würden die zum Nachweis eingesetzten, spezifischen Antikörper sich auch dort anlagern.

TOWBIN und GORDON (1984) schlagen dafür eine Inkubation in 10 %igem Pferdeblutserum vor. Bei späterer Überschichtung mit spezifischen Antikörpern in Serumanteilen erweist sich eine 10 %ige BSA-Lösung (Bovines Serumalbumin) als günstiger (TOWBIN und GORDON, 1984). Daneben werden auch Gelatine, Hämoglobin und nichtionische Detergentien wie Tween 20 (Polyoxyethylensorbit-monolaurat) verwendet. Die Inkubation mit BSA bewirkt außerdem die Renaturierung des Antigens bei SDS-Gelen. SDS wirkt auf Protein und somit auf das Antigen denaturierend, was sich ohne eine anschließende Renaturierung negativ auf die Bindung von spezifischen Antikörpern auswirken würde.

Voraussetzung für den spezifischen Nachweis von an die Membran gebundenen Molekülen ist, daß der Ligand sichtbar gemacht wird, z. B. durch radioaktive Markierung, Fluoreszenzmarkierung oder Enzymmarkierung.

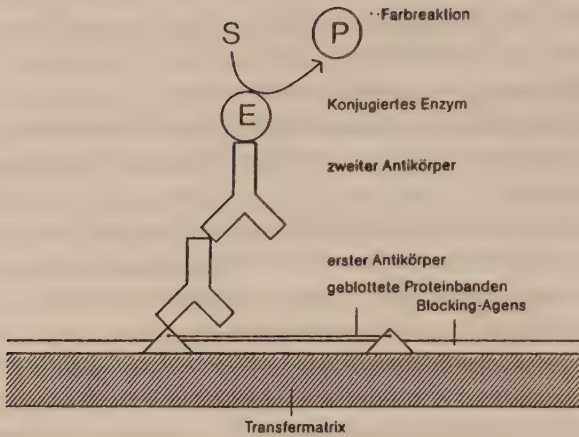
Meistens bedient man sich dabei eines indirekten Verfahrens, bei dem der erste, eigentlich spezifische Ligand keine Markierung trägt, sondern erst ein zweiter, der seinerseits mit dem ersten Antikörper spezifisch reagiert.

Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß die Spezifität und Reaktivität des ersten Liganden nicht durch eine zur Markierung erforderliche Reaktion beeinträchtigt wird (PFISTERER, 1987).

Eine Verstärkung des Signals kann durch die Bindung mehrerer zweiter Liganden am ersten erzielt werden.

Nach dem Transfer auf Nitrozellulose und dem Blocking erfolgt die Inkubation des Blots mit dem ersten, spezifischen Antikörper, wobei Verdünnungsfaktor und Inkubationszeit in einem weiten Umfang je nach Affinität des Antikörpers variieren können (TOWBIN und GORDON, 1984). Der daraus gebildete AG-AK-Komplex ist über das Antigen an die Membran gebunden, weshalb auch nichtpräzipitierende Antikörper wie monoklonale Antikörper verwendet werden können. TOWBIN et al. (1979) sprechen vom "solid phase immunoassay". Zwischen den einzelnen Schritten ist das Waschen der Blots in einem geeigneten Waschpuffer unerlässlich, um lose oder unspezifisch assoziierte bzw. überschüssige Antikörper zu entfernen. Solche Waschpuffer enthalten Detergentien in geringer Konzentration und Zusätze von BSA oder Tween 20. Detergentien sollten allerdings mit Vorsicht verwendet werden, da andernfalls ein erheblicher Verlust an Protein auftreten kann (BEISIEGEL, 1986).

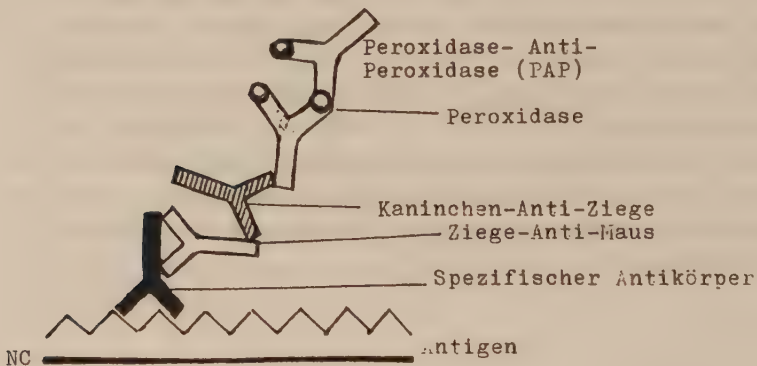
Der zweite Antikörper ist gegen Immunglobulin des Herkunftstieres des ersten Antikörpers gerichtet. In den meisten Fällen ist dieser Antikörper an Enzyme, radioaktive Substanzen oder Fluoreszeinfarbstoffe gekoppelt, um die AG-AK-Komplexe sichtbar zu machen.



Indirekter Immunnachweis mit konjugierter Enzymreaktion

Abb. 3: PFISTERER (1987)

Bei der "Double Label"-Technik (BEISIEGEL, 1986) wird an einen unmarkierten zweiten Antikörper ein markierter dritter bzw. ein Komplex gebunden, der dann die Visualisierung ermöglicht.



Prinzip der PO-Anti-PO-Färbung von Protein-Antikörper-Komplexen auf Nitrozellulose

Abb. 4: BEISIEGEL (1986)

Im letzten Schritt werden nach ausgiebigem Waschen bei enzymgekoppelten Antikörpern die geeigneten Substrate zugegeben und anhand der Farbreaktion die AG-Ak-Bindung nachgewiesen.

Bei Antikörpern, an die radioaktive Substanzen gekoppelt sind, erfolgt die Verbringung der Blots auf einen Röntgenfilm, der mit Schwärzung an den Stellen reagiert, wo das Antigen von einem spezifischen Antikörper erkannt wurde.

Mit Hilfe des Immunoblottings ist die Identifizierung von Proteinuntereinheiten und die Affinitätsverbesserung monospezifischer Antikörper möglich (TOWBIN und GORDON, 1984; GERSHONI und PALADE, 1983; ELKON, 1984).

GERSHONI und PALADE (1983) sprechen in diesem Zusammenhang sogar von den "Monoklonalen des armen Mannes".

Immunoblotting wird heute in der Medizin bereits routinemäßig angewandt zur Diagnostizierung von Autoimmunerkrankungen, Infektionen bakterieller, viraler (KARCHER et al., 1981) oder parasitärer Genese, Tumoren, genetischen Varianten, phänotypischen Varianten, Neuropathien und Allergien (TOWBIN und GORDON, 1984).

Radioaktiv markierte Blots können durch Entfernung der gebundenen Antikörper mit hochkonzentrierter Harnstofflösung für mehrere Nachweisverfahren verwendet werden (ERICKSON et al., 1982).

In der Lebensmittelanalytik zählt das Blotting zwar noch nicht zu den Routinemethoden, wird sich aber im Laufe der Zeit auf Grund seiner Vorteile durchsetzen.

2.5.3.2 Dot-Blotting

Dot-Blotting ist die vereinfachte Variante des Blottings. Dabei wird das Protein nicht von einem Gel eluiert, sondern tropfenförmig direkt auf die Nitrozellulosematrix aufgetragen. Der Proteinauftrag kann auch durch Verbringen der Proben in die Löcher von 96-Loch-Platten, Befestigen gekennzeichneter Nitrozellulosefolien auf der Platte und Drehen der Platte erfolgen. Seit kurzem sind auch Dot-Blotting-Geräte auf dem Markt, die die Proben aus 96-Loch-Platten durch Unterdruck auf die Nitrozellulose verbringen, was gleichmäßigeren Probenauftrag gewährleistet.

Die weitere Behandlung mit Enzymen, radioaktiven Substanzen, Fluoreszein oder Gold erfolgt wie beim herkömmlichen Blotting.

JANSSEN et al. (1986) äußerten lediglich Bedenken, daß es bei nativen Proben zu Interaktionen zwischen der in der Probe enthaltenen Peroxidase und der zur Markierung an die Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase kommen könnte, was sich aber experimentell bislang nicht bestätigte.

Vorteile dieser Methode sind Zeit-, Arbeits- und Materialersparnis (JANSSEN et al., 1986) sowie hohe Sensitivität und geringer Bedarf an Antigen (TOWBIN und GORDON, 1984).

Auch diese Methode ist bei der Diagnostizierung von Allergien und respiratorischen Infektionen bereits routinemäßig im Einsatz (TOWBIN und GORDON, 1984).

2.6 Affinitätschromatographie

Affinitätschromatographie ist eine Art der Adsorptionschromatographie, bei der die zu reinigenden Moleküle spezifisch und reversibel durch eine komplementär bindende Substanz (Ligand) adsorbiert werden, die an eine unlösliche Matrix fest gebunden ist (PHARMACIA, 1979).

Affinitätschromatographie eignet sich für die Reinigung von Substanzen aus komplexen biologischen Gemengen, zur Abtrennung der denaturierten von der nativen Form von ein und derselben Substanz und zur Entfernung kleinerer Mengen biologischen Materials aus großen Mengen verunreinigender Substanzen. Erstmals wurde die Affinitätschromatographie 1910 angewendet, als Amylase selektiv an unlösliche Stärke adsorbiert werden konnte.

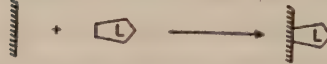
1967 wurde von AXEN et al. berichtet, daß Moleküle mit primären Aminogruppen an Cyanbromid-aktivierte Polysaccharid-Matrices gekoppelt werden konnten, was dem Anfang der heute durchgeführten Affinitätschromatographie gleichkam.

Auch heute ist die Aktivierung mit Cyanbromid die gebräuchlichste Methode zur Ankopplung von Liganden. Voraussetzungen für die Affinitätschromatographie:

- Es muß ein Ligand vorhanden sein, der kovalent an die Matrix gebunden werden kann, ohne daß dadurch seine Affinität zu dem zu reinigenden Material zerstört wird.
- Die gebundene Substanz muß schonend wieder herausgewaschen werden können, ohne daß sie in ihrer Struktur verändert wird.
- Die Matrix muß eine sehr geringe Neigung zur Ausbildung unspezifischer Bindungen aufweisen.



Immobilisieren des Liganden



Adsorbieren der Probensubstanz(en)



Probe

Ablösen der gebundenen Substanz(en)



Prinzip der Affinitätschromatographie

Abb. 5: PHARMACIA (1979)

Anwendungsmöglichkeiten (PHARMACIA, 1979):

Ligand	zu reinigende Substanz
Enzym	analoges Substrat, Inhibitor, Kofaktor
Antikörper	Antigen, Virus, Zelle
Lektin	Polysaccharide, Glykoprotein, Zelloberfläche, Rezeptor, Zelle
Nukleinsäuren	komplementäre Basensequenz, Histone, Nukleinsäurepoly- merase, bindendes Protein
Hormone, Vitamine	Rezeptor, Carrierprotein
Zelle	Zelloberflächen-spezifisches Protein, Lektin

RING et al., (1987) gelang durch Affinitätschromatographie die Reinigung von Anti-Soja-protein-Serum.

In der vorliegenden Arbeit wurde, um die spezifischen Antiseren gegen erhitztes Fleisch, die deutliche Kreuzreaktionen zeigten, zu reinigen als Ligand das Antigen, nämlich Fleischextrakt an die Matrix, eine Säule aus Cyanbromid-aktivierter Sepharose 4B, gekoppelt.

Diese band die kreuzreagierenden Antikörper aus dem Antiserum an sich.

Durch einen Pufferwechsel wurden diese Antikörper wieder herausgewaschen, die Säule war dann erneut verwendbar.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Chemikalien und Geräte

Natriumchlorid krist. z. A.

Kaliumchlorid z. A.

di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat

Kaliumdihydrogenphosphat

Natriumazid reinst

Dodecylhydrogensulfat-Natriumsalz (Sodiumdodecylsulphate = SDS)

Harnstoff z. A.

Aceton

Aluminiumhydroxidlösung (15 g/l)

Cyanbromid-aktivierte Sepharose 4B

Salzsäure

Glyzin

Kaliumthiocyanat

Bovines Serumalbumin (BSA)

Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat

Acrylamid 2x krist. z. A.

N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS)

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)

Ammoniumpersulfat z. A.

Glyzerin wasserfrei

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan z. A. (Tris)

Bromphenolblau

Molekulargewichtsmarker für Proteine leichten Molekulargewichts (14.400-94.000)

Methanol

Essigsäure

Amidoschwarz

Tween 20 (Polyoxyethylensorbit-monolaurat)

Natriumhydrogencarbonat

Alkalische Phosphatase-gekoppeltes Kaninchen-Anti-Maus IgG, IgA, IgM (H+L)
N,N-Dimethylformamid
Nitro Blue Tetrazolium
5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat p-Toluidin-Salz
Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Kaninchen-Anti-Maus Immunglobulin
Natriumacetat
3-Amino-9-ethyl-carbazol
Wasserstoffperoxid 30 %
Natriumdisulfit trocken z. A.
Natriumhydroxid granuliert
Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat z. A.
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz
Kalium-Natrium-Tartrat
Dialyseschlauch
LKB 2005-106 Nitrozellulose (0,45 μ m)
LKB 2005-101 Filterpapier
LKB 2070 Ultrorac Fraktionenkollektor
LKB 2210 2-Kanal-Rekorder
LKB Uvicord S Photometer
Einengungsgeräte und Kollodiumhülsen von Sartorius
LKB Multiphor Elektrophoresekammer
LKB Gradientenmischer
LKB Stromversorgung
Kühlgerät ,
Photometer
Transformator
Balb-c Mäuse, ca. 3 Monate alt, weiblich

3.2 Probenmaterial

3.2.1 Untersuchte Proben

Proteingehalt
in mg/ml in %

Rindfleisch :

Standardproben:

Rindfleisch roh		10,8	7,7
Rindfleisch erhitzt auf 80 °C		11,0	7,9
" "	95 °C	6,9	4,9
" "	110 °C	4,4	3,1
" "	134 °C	9,7	6,9

andere Proben:

Frikadelle Rind		4,8	3,4
Kalbsbraten		3,4	2,4
Rindfleisch (Dampftopf)		1,6	1,1
Rindsroulade (Dampftopf)		1,8	1,3
Corned Beef (Vollkonserve)		4,2	3,0
Rindfleisch (Vollkonserve)		4,4	3,1

Lammfleisch:

Lamm gekocht		6,2	4,4
--------------	--	-----	-----

Schweinefleisch:

Standardproben:

Schweinefleisch roh		18,0	12,8
Schweinefleisch erhitzt auf 80 °C		8,5	6,0
" "	95 °C	4,8	3,4
" "	110 °C	6,2	4,4
" "	134 °C	3,1	2,2

andere Proben:

Schweinefleisch gebraten		7,2	5,1
Schweinegulasch		7,4	5,3
Schweineschnitzel		3,2	2,3
Wildschweinbraten sauer		6,5	4,6
Schweinebauch roh geräuchert		7,5	5,4
Schweinefleisch (Vollkonserve)		3,5	2,5

Geflügelfleisch:

Standardproben:

Putenfleisch roh	16,4	11,7
Putenfleisch erhitzt auf 80 °C	10,6	7,6
" " 95 °C	6,7	4,8
" " 110 °C	5,3	3,8
" " 134 °C	9,7	6,9

andere Proben:

Putenfleisch gebraten	7,3	5,2
Brathendl	7,3	5,2
Ente gekocht	7,0	5,0
Gans gebraten	5,3	3,8
Putenwurst	3,8	2,7
Putenfleisch (Vollkonserve)	2,3	1,6
Hühnerfleisch (Vollkonserve)	2,0	1,4

Fisch:

Standardproben:

Seelachsfleisch roh	13,4	9,6
Seelachsfleisch erhitzt auf 80 °C	7,5	5,4
" " 95 °C	6,7	4,8
" " 110 °C	5,8	4,1
" " 134 °C	4,8	3,4

andere Proben:

Seehecht gebraten	3,9	2,8
Lachersatz, sauer eingelegt	8,3	5,9
Forelle gebraten	9,4	6,7
Makrele geräuchert	27,2	19,4
Scholle gebraten	7,2	5,1
Goldbarsch gebraten	7,2	5,1
Geleehering	2,8	2,0
Hering (Vollkonserve)	7,9	5,6
Thunfisch (Vollkonserve)	11,2	8,0

Fleischproben aus dem Mageninhalt Lebender:

Rindfl. roh, Verweilz. im Magen	15 min	9,4	6,7
"	" 30 min	9,2	6,6
"	" 45 min	8,7	6,2
"	" 60 min	6,8	4,9
Rindfl. gekocht, Verweilz. i. M.	15 min	7,3	5,2
"	" 30 min	7,4	5,3
"	" 45 min	6,5	4,6
"	" 60 min	6,2	4,4

Fleisch aus dem Mageninhalt Verstorbener:

Kalbfleisch gekocht, ca. 16 Std. im Mag.	9,3	6,6
Schweinefl. gebraten, ca. 1 Tag im Mag.	8,3	5,9
Kalbfleisch gekocht, ca. 2 Tage im Mag.	2,4	1,7
Schweinefleisch (fragliche Probe)	5,8	4,1
Rindfleisch " "	12,0	8,6
Rindfleisch " "	8,1	5,8
Rindfleisch " "	4,3	3,1
Rindfleisch " "	2,4	1,7
Schweinefleisch " "	6,4	4,6
Bolus Schweinefleisch roh geräuchert (aus Ösophagus)	7,5	5,4

Als Standardproben werden ohne Zusätze erhitzte Proben bezeichnet. Nachfolgend werden sie mit der Tierart und der Erhitzungstemperatur aufgeführt. Die Extraktion und anschließende Dialyse erfolgte auf gleiche Weise sowohl bei Standard als auch bei anderen Proben nach 3.3.1. Aus 700 mg Ausgangsmaterial wurde nach Extraktion und Dialyse 1 ml Extraktlösung erhalten.

Die prozentualen Angaben bezüglich der Proteinkonzentration in der Extraktlösung beziehen sich auf einen geschätzten Anteil von 20 % Protein im Fleisch.

3.2.2 Gewinnung der Proben

3.2.2.1 Standardproben

Für die Standardproben wurde Muskelfleisch von Rind, Schwein, Pute und Seelachs zerkleinert und dann jeweils eine Probe 20 min bei der jeweiligen Temperatur (80, 95, 110 und 134 °C) im Wärmeschrank bzw. im Autoklaven erhitzt. Sodann erfolgte die Proteinextraktion.

3.2.2.2 Küchenmäßig zubereitete Proben und Konserven

Den zubereiteten Speisen bzw. den Konservendosen wurde Muskelfleisch entnommen und von anhaftenden Soßenresten etc. gereinigt. Dann erfolgte die Proteinextraktion.

3.2.2.3 Emetogen gewonnene Proben

Küchenmäßig zubereitetes und rohes Fleisch wurde verzehrt und nach 15, 30, 45 und 60 min Verweildauer im Magen wieder erbrochen. Um gleiche Bedingungen zu gewährleisten, wurde nach jeder Mahlzeit jeweils nur einmal erbrochen und deshalb der Versuch an mehreren Tagen durchgeführt.

3.2.2.4 Proben aus dem Mageninhalt Verstorbener

Während der Sektion wurde der Mageninhalt in ein Sieb gegeben und mit Wasser so lange gespült, bis nur noch große Partikel zurückblieben. Aus den Fleischpartikeln wurde dann das Protein extrahiert.

3.3 Methoden

3.3.1 Proteinextraktion mit Harnstoff

3.3.1.1 Lösungen

Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline = PBS)

8,0 g Natriumchlorid

0,2 g Kaliumchlorid

1,15 g di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat

0,2 g di-Natriumhydrogenphosphat

0,2 g Natriumazid

ad 1000 ml Aqua dest.

Extraktionspuffer

360 g Harnstoff

30 g SDS

ad 1000 ml Aqua dest.

3.3.1.2 Durchführung der Probenextraktion (nach SCHRÜTER, 1985)

Von den Fleischpartikeln wurden jeweils 700 mg aus deren Mitte herauspräpariert und abgewogen.

Die abgewogenen Partikel wurden mit dem Stößel eines Homogenisators stumpf zerkleinert und anschließend in einem Glashomogenisator mit jeweils 1 ml des zuvor auf ca. 80 °C erhitzten Extraktionspuffers ca. 10 min extrahiert. Der Puffer mit dem gelösten Protein wurde in Röhrchen abgegossen, zentrifugiert und der dabei entstehende Bodensatz sowie die oben schwimmende Fettschicht verworfen.

Der restliche Proteinextrakt wurde zum Entfetten in große Zentrifugenröhrchen gegeben, 1:10 mit Aceton vermischt und kräftig geschüttelt.

Daraufhin wurde 20 min bei 7000 g zentrifugiert und der Überstand anschließend abgossen.

Der nunmehr fettfreie Proteinextrakt wurde mit einem Spatel sorgfältig vom Röhrchenboden gelöst, an der Luft ca. 30 min getrocknet, in ein Röhrchen gegeben und zusammen mit der gleichen Menge Extraktionspuffer, in der er vor der Entfettung mit Aceton gelöst war, zerkleinert und soweit wie möglich gelöst. Der Extrakt mit den ungelösten Proteinklumpchen wurde in Dialyseschläuche gegeben und bei 4 °C über Nacht auf einem Magnetrührgerät unter langsamem Rühren dialysiert. Zur Dialyse von 1 ml Extrakt war 1 l Puffer (physiologische Kochsalzlösung) notwendig. Die Gesamtausbeute an Protein nach dieser Aufarbeitungsmethode betrug zwischen 1 und 20 % (siehe Tab. 3.2.1).

Die Dialyse war erforderlich, da es sonst bei der Elektrophorese durch die in der Probe enthaltenen Salze zu einer Verzerrung der Banden gekommen wäre (WESTERMEIER, 1986). Außerdem wurde der dialysierte Extrakt von den Versuchstieren besser vertragen. Der Inhalt der Dialyseschläuche konnte unter Zusatz von etwas Natriumazid im Kühlschrank ca. 6 Wochen oder bei -18 °C ca. 6 Monate aufbewahrt werden. Nach dieser Methode wurden auch die Proteinextrakte für die Immunisierung der Mäuse zur Gewinnung eines spezifischen Antiserums hergestellt.

3.3.2 Herstellung der Antiseren

3.3.2.1 Lösungen

Aluminiumhydroxidverdünnung 1:4

1 ml Aluminiumhydroxidlösung (15 g/l)

3 ml Aqua inject.

3.3.2.2 Durchführung der Immunisierung

Es wurde mit verschiedenen Extrakten immunisiert, nämlich mit Extrakten aus Rind-, Schweine-, Puten- und Seelachsfleisch. Dabei wurden je 6 Mäuse mit dem Extrakt von auf 80 °C und von auf 134 °C erhitztem Fleisch einer Tierart immunisiert.

Für die Immunisierung benötigte man pro Tier 50 µl Proteinextrakt der in Tab. 3.2.1 angegebenen Standardproben, der mit 50 µl Aluminiumhydroxid-verdünnung vermischt wurde. Die Lösung wurde in einer Tuberkulinspritze aufgezogen und intraperitoneal injiziert.

Nach der Erstimmunisierung erfolgte dreimal im Abstand von jeweils 14 Tagen eine Boosterung. Nach der dritten Boosterung wurden 5 Tage abgewartet, bevor den Mäusen aus einer Schwanzvene Blut entnommen wurde. Im günstigsten Fall konnte so bis zu 1 ml Blut pro Entnahme und Tier gewonnen werden.

10 Tage nach der ersten Blutentnahme konnte erneut Blut abgenommen werden, ohne daß ein weiteres Boostern erforderlich war. Dann empfahl sich eine Pause von mindestens 8 Wochen. Bei späteren Blutentnahmen war dann wieder eine vorherige Boosterung nötig.

Das Blut wurde über Nacht im Kühlschrank stehen-gelassen. Die Seren wurden abzentrifugiert und nach der folgenden Methode weiterverarbeitet.

3.3.3 Affinitätschromatographie

3.3.3.1 Gießen der Antigen-gekoppelten Sepharosesäulen

Cyanbromid-aktivierte Sepharose 4B wurde mit nach 3.3.1 gewonnenem Proteinextrakt von auf 80 °C erhitztem Fleisch, dessen Proteingehalt zuvor mit der Methode nach LOWRY (1951) (3.3.8) bestimmt worden war, gemäß der Vorschrift des Herstellers unter Verwendung der angegebenen Puffer gekoppelt. Es wurde je eine Säule mit Rind-, Schweine-, Puten- und Seelachsfleischextrakt hergestellt. Die oben und unten verschlossene Säule wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt, um die Sepharose sich absetzen zu lassen. Proteinbeladene Säulen sollten stets gekühlt aufbewahrt werden, da sonst ihre Haltbarkeit deutlich herabgesetzt ist.

3.3.3.2 Puffer für die Reinigung der Antiseren

Aufbewahrungs- und Laufpuffer

0,75 g Natriumdihydrogenphosphat
2,59 g di-Natriumhydrogenphosphat
8,77 g Natriumchlorid
0,2 g Natriumazid
ad 100 ml Aqua dest.

Elutionspuffer

25 g Kaliumthiocyanat
ad 100 ml Laufpuffer

3.3.3.3 Entfernung der kreuzreagierenden Antikörper

Nach Vorschrift des Herstellers wurde das zu reinigende Antiserum zusammen mit Laufpuffer auf die Säule aufgetragen. Jedes Antiserum wurde hintereinander über 3 Säulen laufen gelassen, gegen die es nicht gerichtet war, z. B. Anti-Rindfleisch-Serum gegen mit Schweine-, Puten- und Seelachsfleisch gekoppelte Säulen.

Die Säule war mit einem Photometer verbunden, an das ein 2-Kanal-Rekorder und ein Fraktionenkollektor angeschlossen waren. Der erste aufgezeichnete Peak repräsentierte das verdünnte, gereinigte Antiserum und wurde gewonnen.

Um die an die Säule gebundenen Antikörper, die zuvor die Kreuzreaktion des Antiserums mit dem Fleischextrakt anderer Tierarten verursacht hatten, wieder auszuwaschen, wurde an Stelle des Laufpuffers Elutionspuffer aufgetragen. Es wurde erneut ein kleiner Peak aufgezeichnet, der die ausgewaschenen kreuzreagierenden Antikörper repräsentierte.

Nach Reinigung der Säule mit Elutionspuffer mußte für ca. 1 Stunde wieder Laufpuffer auf die Säule gegeben werden, um den Elutionspuffer auszuwaschen, da dieser die Säule zerstört hätte.

Bis zum nächsten Gebrauch wurde die Säule in Laufpuffer im Kühlraum aufbewahrt.

Jedes Antiserum erreichte eine ausreichende Tierartspezifität erst nachdem es über 3 Säulen gelaufen war.

3.3.3.4 Einengung der gereinigten Antiseren

Um die Antiseren über weitere Säulen laufen lassen zu können, mußten sie auf ihr Ausgangsvolumen eingengt werden. Dies erfolgte mit Hilfe von Einengungsgeräten, die mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt wurden.

Die Kollodiumhülsen wurden auf den Einengungsgeräten befestigt. Oben in die Glasröhren wurde die einzuziehende Lösung gegeben.

Jedes Einengungsgerät war an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und stand unter Unterdruck.

Wenn der Flüssigkeitsspiegel in den Kollodiumhülsen abnahm, wurde nachgegossen, bis das Antiserum sein Ausgangsvolumen erreicht hatte.

Zur Schonung des Antiserums war es nötig, daß die Einengung, die bis zu 24 Stunden dauerte, im Kühlraum erfolgte.

3.3.4 SDS-PAG-Elektrophorese (nach GÜRG et al.,
1980; GÜRG et al., 1981 modifiziert)

3.3.4.1 Lösungen und Puffer

Iris-Glyzin-Elektrodenpuffer (pH 8,3)

15,15 g Tris

72 g Glyzin

5 g SDS

ad 5000 ml Aqua dest.

Gelpuffer (pH 8,8)

22,71 g Tris

ca. 180 ml Aqua dest.

auf pH 8,8 mit Salzsäure (2 mol/l) einstellen und mit
Aqua dest. auf 250 ml auffüllen.

"Schwere" Gellösung (18 % Polyacrylamid)

18 g Acrylamid

0,5 g BIS

ad 75 ml 3:4 mit Wasser vermisches Glyzerin

ad 100 ml Gelpuffer

"Leichte" Gellösung

12,5 ml Gelpuffer

ad 50ml Aqua dest.

Ammoniumpersulfat-Lösung

100 mg Ammoniumpersulfat

ad 1 ml Aqua dest.

Probenpuffer_(pH_6,8)

2,0 g SDS

0,75 g Tris

10,0 ml Glyzerin

mit Salzsäure (2 mol/l) auf pH 6,8 einstellen

ad 50 ml Aqua dest.

Als Modifikation zur oben erwähnten Methode nach GÜRG et al., 1980 und GÜRG et al., 1981 enthält der Probenpuffer kein Mercaptoethanol.

Bromphenolblau-Lösung

10 mg.Bromphenolblau

100 ml Probenpuffer

Da Acrylamid in monomerem Zustand karzinogen und neurotoxisch ist, sollte sowohl die Inhalation als auch jeglicher Hautkontakt vermieden werden. Es empfiehlt sich, unter einem Abzug mit Handschuhen und Pipettierhilfen zu arbeiten.

Die Acrylamidlösung ist bei Lagerung im Kühlschrank in dunkler Flasche ca. 4 Wochen haltbar. Die Ammoniumpersulfatlösung sollte stets frisch hergestellt werden.

3.3.4.2 Gießen eines linearen Gradientengels

Die zur Kammer gehörenden Glasplatten wurden mit Ethanol entfettet.

Es konnten 2 Gele auf einmal gegossen werden, wofür auf beiden Seiten des Gießstandes jeweils 2 Glasplatten anzubringen waren.

Die 1,5 mm dicken Spacer wurden beidseitig eingefettet und rechts und links am Rand zwischen die Glasplatten eingefügt, wobei auf einen exakten Abschluß mit den unteren Kanten der Platten besonders zu achten war, um ein späteres Auslaufen der Gel-lösung zu vermeiden. Die Glasplatten wurden mit den dafür vorgesehenen Klammern und Schrauben am Gieß-

stand fixiert, wie der Beschreibung des Herstellers zu entnehmen war.

Mit Hilfe einer Wasserwaage wurde sichergestellt, daß der Gießstand waagrecht und auf ebener Unterlage stand.

Wichtig war der luftfreie Kontakt der Glasplatten zur Gummidichtung auf dem Grund des Gießstandes.

Der Gradientenmischer wurde auf einem Magnetrührgerät so angebracht, daß er sich ca. 10 cm über der Oberkante der Glasplatten befand. Beide Ventile des Gradientenmischers waren geschlossen. In beide Zylinder wurden je 17,5 mg SDS gegeben.

In den Zylinder, aus dem der Schlauch austrat, wurden 17,5 ml "schwere" (18 % Polyacrylamid), in den anderen 2,0 ml "schwere" und 15,5 ml "leichte" Gellösung (2,1 % P.) gegeben. Mit Rührstäben wurden die Lösungen durchgemischt.

Das freie Schlauchende wurde in der Mitte zwischen die festgeschraubten Glasplatten gesteckt.

Unter Rühren wurde in den Zylinder mit der weniger konzentrierten Gellösung 4,4 μ l Ammoniumpersulfat-Lösung und 7,6 μ l TEMED pipettiert, in den anderen 26 μ l Ammoniumpersulfat-Lösung und 7,6 μ l TEMED.

Unter fortwährendem Rühren wurden dann gleichzeitig beide Ventile geöffnet, so daß die Lösung zwischen die Glasplatten laufen konnte. War dieser Vorgang beendet, wurde der Slotformer zwischen die Glasplatten gesteckt. Der Gradientenmischer war sofort zu reinigen, damit die Polyacrylamidlösungen nicht in ihm auspolymerisierten.

Zum Polymerisieren der Gele wurde der Gießstand mit einem feuchten Tuch bedeckt und über Nacht stehen gelassen.

3.3.4.3 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine

Die Slotformer wurden entfernt und die Slots mit Aqua dest. ausgespült, das anschließend mit einer Spritze abgesaugt wurde.

Die Slots wurden mit Elektrodenpuffer gefüllt. Dann wurden zunächst je 5 μ l Bromphenolblau-Lösung und daraufhin 1:2 mit Probenpuffer verdünnter Proteinextrakt einpipettiert. Dabei wurden von den Extraktlösungen aus Standardproben je 5 μ l, von den anderen Proben je 25 μ l mit jeweils der gleichen Menge an Probenpuffer vermischt. Der Proteingehalt der jeweiligen Proben ist aus Tab. 3.2.1 zu ersehen. Diese Probenlösung wurde nicht, wie es bei sonstigen Elektrophoresemethoden üblich ist, erhitzt und mit Mercaptoethanol versetzt. Versuche hatten ergeben, daß sowohl Erhitzung als auch Zusatz von Mercaptoethanol sich negativ auf die nachfolgende Immunfärbung auswirken, die ja im Vordergrund der Untersuchungen stand.

In einen Slot wurde der nach Angaben des Herstellers vorbereitete Molekulargewichtsmarker eingefüllt. Die Glasplatten mit den Gelen wurden an dem oberen Puffertank unter Befestigung einer Gummidichtung festgeschraubt, vorsichtig aus dem Gießstand gehoben und in den unteren Puffertank eingesetzt. Beide Puffertanks wurden mit Elektrodenpuffer gefüllt. Die Schläuche der auf 4 °C eingestellten Kühlung wurden an die Kühlstäbe angeschlossen und die Pumpe eingeschaltet. Der Deckel der Kammer wurde auf die Elektroden des oberen Puffertankes aufgesteckt und die Kabel mit der Stromversorgung verbunden. Die Proteinauftrennung erfolgte bei 60 mA und 500 V ca. 4,5 Stunden, bis die Bromphenolblau-Front am unteren Rand des Gels in den Elektrodenpuffer austrat, weshalb im weiteren Verlauf bei den Abbildungen stets nur der Start, nicht aber die Front angegeben wird. Dies stellt eine weitere Modifikation zur üblichen Elektrophoresemethode dar.

3.3.5 Elektroblotting

3.3.5.1 Lösungen und Puffer

Transferpuffer

15,15 g Tris

42,75 g Glyzin

ad 4000 ml Aqua dest.

1000 ml Methanol

Färbelösung

0,2 g Amidoschwarz

90 ml Methanol

20 ml Eisessig

90 ml Aqua dest.

Entfärbelösung

900 ml Methanol

200 ml Eisessig

900 ml Aqua dest.

3.3.5.2 Durchführung des Blottings

Gebloftet wurde unverzüglich nach Abschluß des Elektrophoresevorganges.

In den Puffertank des Blotting-Gerätes wurden ca. 4 Liter Transferpuffer gegeben und die auf 4 °C eingestellte Kühlung angeschlossen.

Der restliche Puffer wurde in eine flache Wanne geschüttet, in die ein Plastikgitter mit Schwamm und ein Blatt Filterpapier zum Vollsaugen gelegt wurden. Auf das Filterpapier wurde Nitrozellulosefolie so aufgelegt und vorsichtig festgestrichen, daß keine Luftblasen zwischen Filter und Folie vorhanden waren.

Um Fingerabdrücke zu vermeiden, wurde Nitrozellulose stets nur mit Handschuhen angefaßt.

Das aus den Glasplatten entnommene und von den Slots befreite Gel wurde vorsichtig auf die Nitrozellulose gelegt, ebenfalls unter Vermeidung von Luftblasen.

Darauf wurde ein weiteres befeuchtetes Blatt Filterpapier und ein zweites Plastikgitter gelegt.

Die beiden Plastikgitter ergaben durch Zusammen-drücken des Verschußmechanismus eine Einheit.

Mit zwei solchen Einheiten mit jeweils einem Gel konnte gleichzeitig geblottet werden.

Die Gitter wurden so in die dafür vorgesehenen Schienen des Puffertanks geschoben, daß sich die Nitrozellulose auf der der Anode zugewandten Seite befand.

Der mit einem Verbindungskabel zu einem Transformator versehene Deckel wurde auf den Puffertank gesetzt und das Blottinggerät eingeschaltet.

Bei 100 % Leistung und einer Stromstärke von 0,95 A wurde 1 Stunde geblottet.

Eine versuchsweise durchgeführte nachträgliche Anfärbung der PAG-Gele mit Coomassie Blue zeigte, daß sich kein Protein mehr auf den Gelen befand, d. h. der Proteinübergang von den PAG-Gelen auf die Nitrozellulose quantitativ erfolgt war.

Im Anschluß an das Blotten wurden auf der Nitrozellulosefolie mit Bleistift die einzelnen Bahnen anhand der am Gel noch erkennbaren Slotansätze gekennzeichnet und numeriert.

Sollte eine Inkubation mit verschiedenen Antiseren durchgeführt werden, so war die Nitrozellulose auf glatter Unterlage in die betreffenden Stücke zu zerschneiden.

Nach der Kennzeichnung der Blots wurde das Gel abgehoben und verworfen.

3.3.5.3 Anfärben der Nitrozellulosefolie

Die Nitrozellulosefolie konnte insgesamt angefärbt werden, wenn das Bandenmuster von Proben dargestellt werden sollte. War eine Immunfärbung der Blots beabsichtigt, so wurden nur die Bahn mit dem Molekulargewichtsmarker sowie ein bis zwei Bahnen mit Probenextrakt angefärbt, um den Erfolg des Blottings zu kontrollieren.

Dafür wurde die anzufärbende Folie für 15 min in die Färbelösung gelegt, anschließend 5 min lang entfärbt und bis zum Photographieren unter Wasser aufbewahrt. Der Streifen mit dem Molekulargewichtsmarker wurde bis zum Ende der Immunfärbung aufbewahrt, um das Molekulargewicht der angefärbten Banden zu bestimmen.

3.3.5.4 Dot-Blotting

Der Probenextrakt wurde nicht elektrophoretisch aufgetrennt und auch nicht über Elektroblothing auf Nitrozellulose übertragen, sondern direkt auf die mit Bleistift markierten Nitrozellulosebezirke mit einer Pipette aufgetragen, wobei 5 μ l/Bezirk ausreichten. Die Immunfärbung wurde wie beim Elektroblothing durchgeführt.

3.3.6 Immunfärbung mit alkalischer Phosphatase

3.3.6.1 Lösungen

Albuminlösung (100 g/l)

5 g BSA

ad 50 ml physiologische Kochsalzlösung

Albuminlösung (30 g/l)

1,5 g BSA

ad 50 ml physiologische Kochsalzlösung

PBS mit Tween 20-Zusatz

5 ml Tween 20

ad 1000 ml PBS

Puffer (pH 9,8)

0,42 g di-Natriumhydrogencarbonat

0,10 g Magnesiumchlorid

ad 50 ml Aqua dest.

Substratlösung

7,5 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat

15 mg Nitro Blue Tetrazolium

400 µl N,N-Dimethylformamid

in 50 ml Puffer (pH 9,8)

erst kurz vor Gebrauch herstellen

3.3.6.2 Färbemethode

Die Nitrozellulose wurde sofort nach dem Blotting bei 37 °C 2 Stunden auf einem Schüttler in Albuminlösung (100 g/l) inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen.

Danach wurde dreimal je 10 min mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Anschließend wurde das spezifische Antiserum in Albuminlösung (30 g/l) 1:1000 verdünnt und die Blots darin bei 37 °C auf dem Schüttler über Nacht inkubiert.

Anschließend wurde wieder gewaschen.

Dann wurden die Blots für 2 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler mit dem enzymgekoppelten Antikörper inkubiert, der in einer Konzentration von 1:1000 in PBS mit Tween 20-Zusatz vorlag.

Erneut wurde dreimal je 10 min mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Die Substratlösung wurde auf die Blots gegeben und wirkte unter Lichteinwirkung 15 min ein, bis violette Banden sichtbar wurden. Bis zum Photographieren wurden die angefärbten Blots unter Wasser im Dunkeln aufbewahrt, jedoch höchstens 2 Tage, da der Hintergrund nachdunkelte.

Anhand des Blots mit dem Molekulargewichtsmarker ließ sich das Molekulargewicht der enzymgefärbten Proteine bestimmen.

3.3.7 Immunfärbung mit Meerrettichperoxidase

3.3.7.1 Lösungen

Blocking-Puffer

6,06 g Tris

8,76 g Natriumchlorid

2 ml Tween 20

ad 1000 ml Aqua dest.

Inkubationspuffer

6,06 g Tris

8,76 g Natriumchlorid

0,5 ml Tween 20

ad 1000 ml Aqua dest.

Carbazol-Stammlösung

500 mg 3-Amino-9-ethyl-carbazol

ad 50 ml Aceton

bei 4 °C in dunkler Flasche aufbewahren

Natriumacetat-Puffer (pH 5,0)

6,8 g Natriumacetat

mit Essigsäure (1 mol/l) auf pH 5,0 einstellen
ad 1000 ml Aqua dest.

Carbazol-Färbelösung

2,0 ml Carbazol-Stammlösung

50 ml Natriumacetat-Puffer

25 µl Wasserstoffperoxid

kurz vor Gebrauch herstellen, keine Filtration nötig

Disulfitlösung

0,95 g Natriumdisulfit

ad 100 ml Aqua dest.

3.3.7.2 Färbemethode

Die Nitrozellulosestreifen wurden sofort nach dem Blotting für 5 min in Blocking-Puffer gelegt, um unspezifische Bindungen abzusättigen.

Daraufhin wurde dreimal je 10 min in Inkubationspuffer gewaschen, bevor das 1:1000 in Inkubationspuffer verdünnte, spezifische Antiserum auf die Blots gegeben wurde. Die Inkubation mit dem Antiserum erfolgte über Nacht auf einem Schüttler bei 37 °C.

Im Anschluß wurde erneut wie beschrieben gewaschen.

Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, an den Meerrettichperoxidase gekoppelt war, erfolgte 2 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler, wobei der Antikörper 1:1000 in Inkubationspuffer verdünnt wurde.

Auch nach dieser Inkubation wurden die Blots wieder gewaschen. Daraufhin wurden sie 5 bis 15 min mit Carbazol-Färbelösung angefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser gespült, um die Reaktion zu stoppen.

Wurden die Blots für 5 min in Disulfitlösung gelegt, blieben die angefärbten Banden besser sichtbar, da der Hintergrund nicht so nachdunkelte. Trotzdem sollte am gleichen Tag fotografiert werden. Bei der Verwendung von Peroxidase war strikt darauf zu achten, daß keine der Lösungen den Peroxidase-inhibitor Natriumazid enthielt.

3.3.8 Quantitative Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951)

3.3.8.1 Lösungen

Natronlauge (0,8 mol/l)

3,2 g Natriumhydroxid
ad 100 ml Aqua dest.

SDS-Lösung

0,5 g SDS
ad 50 ml Aqua dest.

Proteinstandardlösung

10 mg BSA
ad 100 ml Aqua dest.

Reagenz A

40 g Natriumcarbonat
200 ml Aqua dest.
einrühren in
0,4 g Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat
200 ml Aqua dest.

Reagenz B

75 ml Aqua dest.
25 ml SDS-Lösung
50 ml Natronlauge
50 ml Reagenz A

Folin-Reagenz

10 ml Folin

50 ml Aqua dest.

3.3.8.2 Durchführung der Proteinbestimmung

Nach Ansetzen der Lösungen wurden zunächst die Standardverdünnungen vorbereitet. Dafür wurden von der Standardlösung 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 μ l in jeweils 2 Röhrchen pipettiert und mit SDS-Lösung (1 g/100 ml) auf jeweils 1 ml aufgefüllt. In ein Röhrchen kam als Leerwert 1 ml SDS-Lösung. Von dem Probenextrakt, dessen Proteingehalt bestimmt werden sollte, wurden je 10 und je 5 μ l in ein Röhrchen pipettiert und mit SDS-Lösung auf 1 ml aufgefüllt. In jedes Röhrchen wurde 1 ml Reagenz B pipettiert. Nach 10 min wurden in jedes Röhrchen 500 μ l Folinreagenz pipettiert und sofort gemischt. Frühestens 30 min nach Zugabe des Folinreagenzes konnten die Proteinkonzentrationen bei 750 nm gemessen werden, wobei mit dem Leerwert zunächst auf Null abgeglichen wurde. Anhand der Werte des Proteinstandards wurde die Eichkurve erstellt, wobei an der Abszisse die bekannte Proteinkonzentration des Standards in μ g/ml und an der Ordinate der Extinktionswert aufgetragen wurde. Dabei ergab sich eine fast linear verlaufende Kurve, die durch den Nullpunkt ging. Anhand dieser Kurve wurde der Proteingehalt der Proben abgelesen, wobei der erhaltene Wert mit 100 (bei 10 μ l Probe) bzw. mit 200 (bei 5 μ l Probe) multipliziert werden mußte. Das Ergebnis wurde in der Einheit μ g/ml erhalten.

3.4 Ergebnisse

Bei dieser Methode handelt es sich um einen rein qualitativen Nachweis.

Beim durchgeführten Screening der Fleischproben wurde der primäre Wert auf den Immunoblot gelegt und nicht auf die Coomassie-Blue-Anfärbung. Um die Technik jedoch vollständig darzustellen, wurden in Abb. 8 exemplarisch die Proteine nach Elektroblothing mit Amidoschwarz dargestellt. Man erkennt, daß eine gute Übertragung stattgefunden hat (siehe auch 3.3.5.2). Abb. 8 zeigt ferner den untersuchten Molekulargewichtsbereich in der unteren Hälfte des Gradientengels.)

Beweisend bei dieser Nachweisreaktion ist jede deutlich angefärbte Bande, weshalb sowohl Vergleichsproben als auch densitometrische Auswertungen nicht nötig sind.

In den folgenden Tabellen werden positiv verlaufene Nachweisreaktionen mit einem "+", negativ verlaufene mit einem "-" dargestellt.

Da der Elektrophoresevorgang solange durchgeführt wurde, bis die Bromphenolblaufront in den Elektrodenpuffer ausgetreten war, wurde bei den Abbildungen jeweils nur der Start, nicht aber die Front angegeben.

3.4.1 Immunfärbung mit ungereinigten Antiseren

Die Immunfärbung mit auf 80 °C erhitzten Standardproben ergab in allen Fällen Kreuzreaktionen, sowohl bei der Verwendung von gegen auf 80 °C erhitztes Fleisch gerichteten Antiseren als auch, wenn die Seren gegen auf 134 °C erhitztes Material gerichtet waren.

Als Standardproben werden ohne Zusätze erhitzte Proben bezeichnet. Nachfolgend werden sie mit der Tierart und der Erhitzungstemperatur aufgeführt, z. B. Rind 80 °C, Schwein 134 °C etc..

Es wurden je 5 μ l von den Standardproben auf dem Gel aufgetrennt.

Die Antiseren wurden 1:1000 in Rinderalbuminlösung (3 g/100 ml) verdünnt.

Tab. 1: Reaktion der auf 80 °C erhitzten Standardproben mit den ungereinigten Antiseren

Antiserum (1:1000)	Standardproben			
	1	2	3	4
	Rind 80 °C	Schwein 80 °C	Pute 80 °C	Seelachs 80 °C
Anti-Rind				
80 °C-Serum	+	+	+	+
Anti-Schwein				
80 °C-Serum	+	+	+	+
Anti-Pute				
80 °C-Serum	+	+	+	+
(Abb. 6)				
Anti-Seelachs				
80 °C-Serum	+	+	+	+
(Abb. 7)				
Anti-Rind				
134 °C-Serum	+	+	+	+
Anti-Schwein				
134 °C-Serum	+	+	+	+
Anti-Pute				
134 °C-Serum	+	+	+	+
Anti-Seelachs				
134 °C-Serum	+	+	+	+

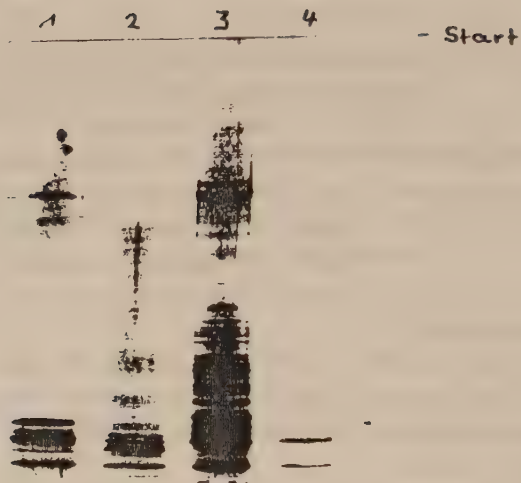


Abb. 6: Reaktion der ungereinigten, gegen auf 80 °C erhitztes Putenfleisch gerichteten Antiseren mit auf 80 °C erhitzten Standardproben (siehe Tab. 1)
(Blot von PAG mit linearem Gradienten von 2 - 18 %)



Abb. 7: Reaktion der ungereinigten, gegen auf 134 °C erhitztes Seelachsfleisch gerichteten Antiseren mit auf 80 °C erhitzten Standardproben (Siehe Tab. 1)
(Blot von PAG mit linearem Gradienten von 2 - 18 %)

3.4.2 Immunfärbung mit gereinigten Antiseren

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie gelang die Eliminierung der Kreuzreaktionen.

Sowohl die Antiseren gegen auf 80 °C als auch die gegen auf 134 °C erhitztes Material reagierten spezifisch mit den auf 80 °C erhitzten Standardproben (je 5 µl).

Tab. 2: Reaktion der auf 80 °C erhitzten Standardproben mit den gereinigten Antiseren

Antiserum (1:1000)	Standardproben			
	1	2	3	4
	Rind 80 °C	Schwein 80 °C	Pute 80 °C	Seelachs 80 °C
Anti-Rind				
80 °C-Serum	+	-	-	-
Anti-Schwein				
80 °C-Serum	-	+	-	-
Anti-Pute				
80 °C-Serum	-	-	+	-
(Abb. 8 A)				
Anti-Seelachs				
80 °C-Serum	-	-	-	+
(Abb. 9)				

	1	2	3	4
Anti-Rind				
134 °C-Serum	+	-	-	-
Anti-Schwein				
134 °C-Serum	-	+	-	-
Anti-Pute				
134 °C-Serum	-	-	+	-
(Abb. 10)				
Anti-Seelachs				
134 °C-Serum	-	-	-	+

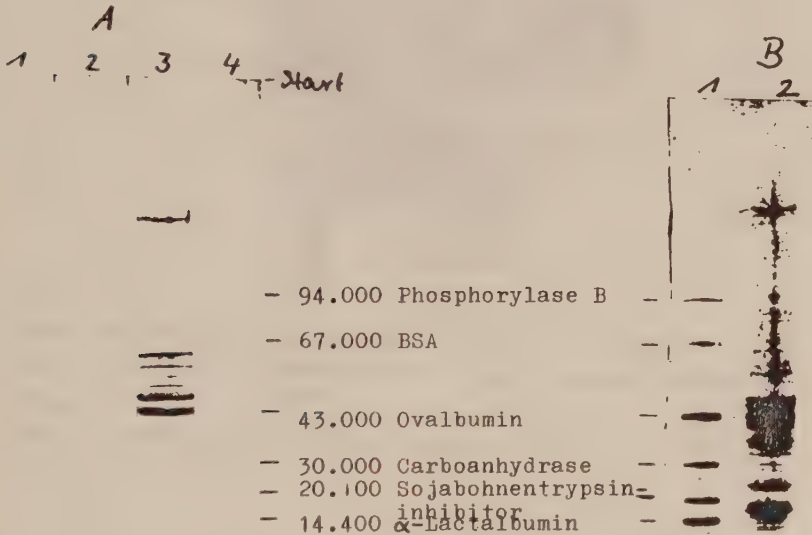


Abb. 8 A: Reaktion der auf 80 °C erhitzten Standardproben mit gereinigtem Anti-Pute 80 °C-Serum (siehe Tab. 2)

Abb. 8 B: Bahn 1 zeigt einen Molekulargewichtsmarker mit den oben angegebenen Proteinstandards.

Bahn 2: Pute 80 °C zeigt gute Proteinausbeute bei Elektroblobmethode. Beide Bahnen wurden nach dem Blotting lediglich mit Amidoschwarz angefärbt. Der Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker (8 B, Bahn 1) zeigt, daß sich die immungefärbten Banden (8 A, Bahn 3) in einem Molekulargewichtsbereich von 40.000 - 60.000 kDa befinden.
(Blot von PAG mit linearem Gradienten von 2 - 18%)

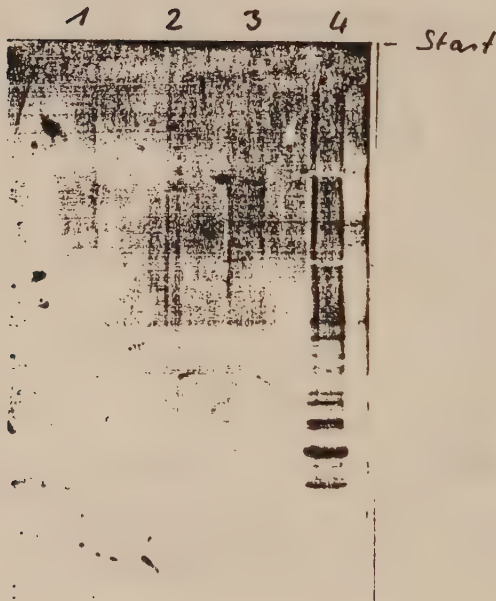


Abb. 9: Reaktion des gereinigten Anti-Seelachs 80 °C-Serums mit auf 80 °C erhitzten Standardproben (siehe Tab. 2)
(Blot von PAG mit linearem Gradienten von 2 - 18 %)

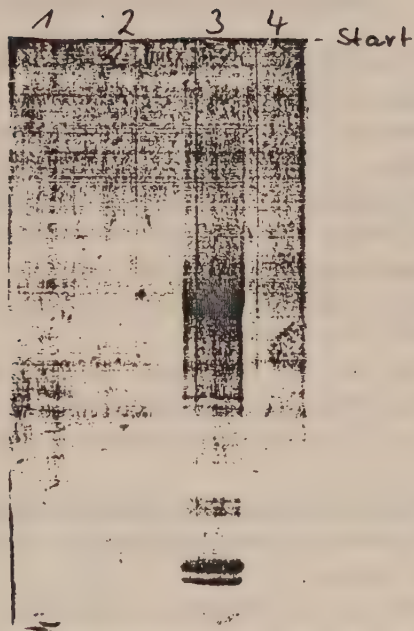


Abb. 10: Reaktion des gereinigten Anti-Pute 134 °C-Serums mit auf 80 °C erhitzten Standardproben (siehe Tab. 2)

(Blot von PAG mit linearem Gradienten von 2 - 18%)

3.4.3 Tierartspezifität der gereinigten Antiseren

Bei der Immunfärbung von küchenmäßig zubereiteten Proben zeigte sich, daß Antiseren, die gegen Rindfleisch gerichtet sind, auch mit Lammfleisch reagieren.

Gegen das Fleisch von Hausschweinen gerichtete Antiseren reagierten auch mit Fleisch von Wildschwein. Gegen Pute gerichtete Antiseren zeigten nicht nur mit Putenfleisch, sondern auch mit Fleisch anderer Geflügelsorten Reaktionen.

Ebenso läßt sich mit den gegen Seelachsfleisch gerichteten Antiseren sowohl Fleisch von Seefischen als auch von Süßwasserfischen verschiedener Familien nachweisen.

Wieder zeigte sich kein Unterschied zwischen dem Antiserum gegen auf 80 °C und gegen auf 134 °C erhitztes Fleisch.

Im Gegensatz zu den Standardproben wurden bei allen küchenmäßig zubereiteten Proben jeweils 25 µl aufgetragen.

Tab. 3: Reaktion der gereinigten Antiseren mit zubereitetem Rind- bzw. Lammfleisch

Antiserum (1:1000)	Proben		
	1	2	3
	Frikadelle Rind	Kalbs- braten	Lamm gekocht
Anti-Rind			
80 °C-Serum	+	+	+
Anti-Rind			
134 °C-Serum	+	+	+

Tab. 4: Reaktion der gereinigten Antiseren mit zubereitetem Schweinefleisch

Antiserum (1:1000)	Proben			
	1	2	3	4
	Schweine- braten	Schweine- gulasch	Schweine- schnittel	Wildschw. sauer
Anti-Schwein				
80 °C-Serum	+	+	+	+
Anti-Schwein				
134 °C-Serum	+	+	+	+

Tab. 5: Reaktion der gereinigten Antiseren mit zubereitetem Geflügelfleisch

Antiserum (1:1000)	Proben				
	1	2	3	4	5
	Pute	Brat-	Ente	Gans	Puten-
	gebrat.	hendl	gekocht	gebrat.	wurst
Anti-Pute					
80 °C-Serum	+	+	+	+	+
(Abb. 11)					
Anti-Pute					
134 °C-Serum	+	+	+	+	+

Tab. 6: Reaktion der gereinigten Antiseren mit Standardproben bzw. küchenmäßig zubereiteten Fischproben

Antiserum (1:1000)	Proben				
	1	2	3	4	5
	Rind	Schwein	Pute	See-	See-
				lachs	hecht
	80 °C	80 °C	80 °C	80 °C	gebrat.
Anti-Seelachs					
80 °C-Serum	-	-	-	+	+
(Abb. 12)					
Anti-Seelachs					
134 °C-Serum	-	-	-	+	+

	6	7	8	9	10
	Lachs	Forelle	Makrele	Scholle	Gold-
	ersatz	gebrat.	geräuch.	gebrat.	barsch
					gebrat.
Anti-Seelachs					
80 °C-Serum	+	+	+	+	+
(Abb. 12)					
Anti-Seelachs					
134 °C-Serum	+	+	+	+	+

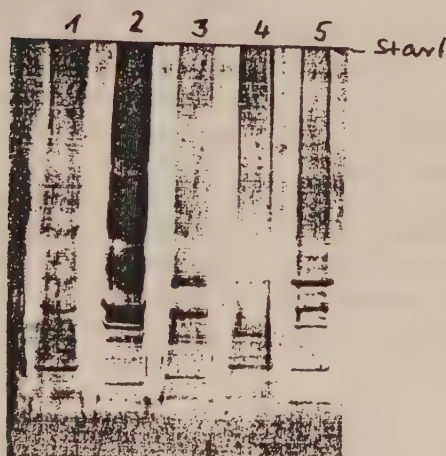


Abb. 11: Reaktion des gereinigten Anti-Pute 80 °C-Serums mit verschiedenen Geflügelfleischproben (siehe Tab. 5)

(Blot von PAG mit linearem Gradienten von 2 - 18 %)

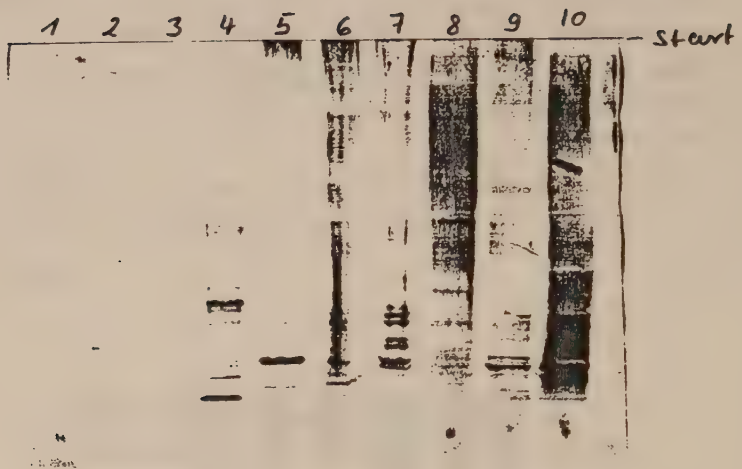


Abb. 12: Reaktion des gereinigten Anti-Seelachs
80 °C-Serums mit auf 80 °C erhitzten Standardproben
und Fleisch verschiedener Fischarten (siehe Tab. 6)
(Blot von PAG mit linearem Gradienten von 2 - 18%)

3.4.4 Identifizierbarkeit hoch erhitzter Proben

Rind- und Schweinefleisch, das auf herkömmliche Art gekocht oder gebraten worden war, war ohne Probleme nachweisbar. Bei Erhitzen der Proben im Schnellkochtopf (121 °C) war ein Nachweis jedoch nicht mehr möglich, weshalb auch Proben aus Vollkonserven nicht nachweisbar waren.

Auf 120 °C erhitztes Geflügelfleisch in küchenmäßiger Verarbeitung war nachweisbar, bei Vollkonserven versagte die Nachweismethode.

Bei Fischfleisch war ein Nachweis bei Vollkonserven möglich, wobei die Banden aber deutlich heller waren als bei anders behandelten Proben.

Standardproben von Seelachsfleisch konnten mit dem Dot-Blotting-Verfahren selbst bei Erhitzung auf 134 °C noch nachgewiesen werden.

Von küchenmäßig zubereiteten Proben und Vollkonserven wurden wieder 25 µl aufgetragen. Der Zusatz "Dose" in der Tabelle bedeutet, daß es sich um Fleisch aus Vollkonserven handelt.

Tab. 7: Reaktion der gereinigten Antiseren mit
verschieden erhitzten Rindfleisch- bzw.
Lammfleischproben

Antiserum (1:1000)	Proben			
	1	2	3	4
	Frika- delle Rind	Kalbs- braten	Rind- fleisch Dampftopf	Rinds- roulade Dampftopf
Anti-Rind 80 °C-Serum	+	+	-	-
Anti-Rind 134 °C-Serum	+	+	-	-
	5	6	7	
	Corned Beef Dose	Rind- fleisch Dose	Lamm gekocht	
Anti-Rind 80 °C-Serum	-	-	+	
Anti-Rind 134 °C-Serum	-	-	+	

Tab. 8: Reaktion der gereinigten Antiseren mit
verschieden erhitzten Schweinefleischproben

Antiserum (1:1000)	Proben			
	1	2	3	4
	Schweine- braten	Schweine- gulasch	Schweine- schnittel	Wild- schwein
Anti-Schwein 80 °C-Serum	+	+	+	+
Anti-Schwein 134 °C-Serum	+	+	+	+
(Abb. 13)				
	5	6		
	Schweine- bauch	Schwein roh Dose		
Anti-Schwein 80 °C-Serum	+	-		
Anti-Schwein 134 °C-Serum	+	-		
(Abb. 13)				

Tab. 9: Reaktion der gereinigten Antiseren mit
verschieden erhitzten Geflügelfleischproben

Antiserum (1:1000)	Proben			
	1	2	3	4
	Pute ge- kocht 110 °C	Pute ge- kocht 120 °C	Huhn Dose	Pute Dose
Anti-Pute 80 °C-Serum	+	+	-	-
Abb. 14)				
Anti-Pute 134 °C-Serum	+	+	-	-

Tab. 10: Reaktion der gereinigten Antiseren mit
verschieden erhitzten Fischfleischproben

Antiserum (1:1000)	Proben		
	1	2	3
	Gelee- hering	Hering Dose	Thunfisch Dose
Anti-Seelachs 80 °C-Serum	+	+	+
Anti-Seelachs 134 °C-Serum	+	+	+

Tab. 11: Reaktion des gereinigten Anti-Seelachs
80 °C-Serums mit verschiedenen erhitzten
Standardproben im Dot-Blotting-Verfahren
(Abb. 15)

Antiserum (1:1000)	Proben				Erhitzungs- temperatur
	Rind	Schwein	Pute	Seelachs	
Anti-	-	-	-	+	roh
See-	-	-	-	+	80 °C
lachs	-	-	-	+	95 °C
80 °C-	-	-	-	+	110 °C
Serum	-	-	-	+	134 °C

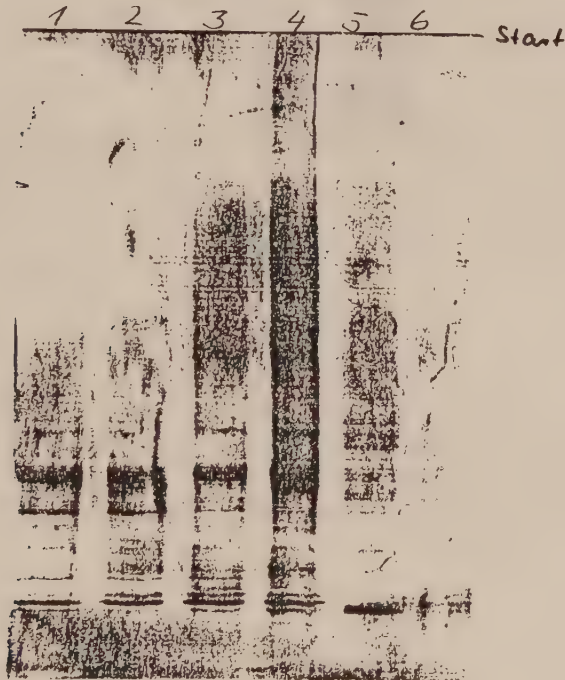


Abb. 13: Reaktion des gereinigten Anti-Schwein
134 °C-Serums mit verschiedenen erhitzten Schweine-

fleischproben (siehe Tab. 8)

(Blot von PAG mit linearem Gradienten von 2 - 18 %)

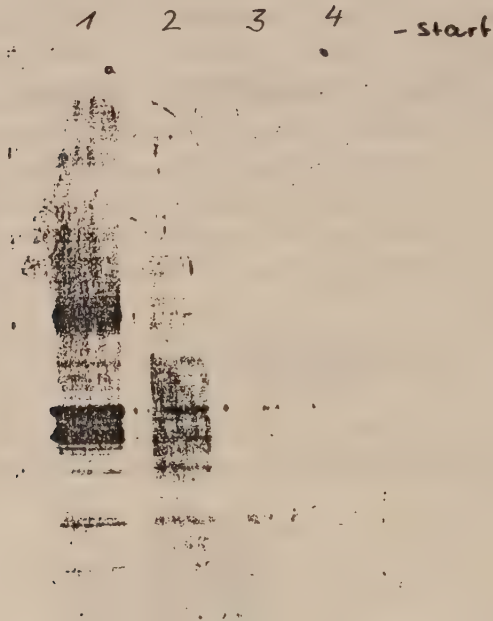


Abb. 14: Reaktion des gereinigten Anti-Pute 80 °C-Serums mit verschieden erhitzten Geflügelfleischproben (siehe Tab. 9)

(Blot von PAG mit linearem Gradienten von 2 - 18%)



Abb. 15: Reaktion des Anti-Seelachs 80 °C-Serums mit
verschieden erhitzten Standardproben im Dot-
Blotting-Verfahren (siehe Tab. 11)

3.4.5 Proben aus dem Mageninhalt Lebender

Bei den unterschiedlichen Verweilzeiten von 15, 30, 45 und maximal 60 min im Magen läßt sich keine zeitliche Grenze festlegen, ab wann die Verdauung des Fleisches so weit fortgeschritten ist, daß ein Nachweis nicht mehr möglich ist.

Da die Proben jeweils aus der Mitte größerer Fleischstücke stammen, ist anzunehmen, daß bei den Proben, die angefärbte Banden zeigen, der Magensaft noch nicht bis ins Innere des Stückes vorgedrungen war. Es wurden wieder 25 µl Probenextrakt aufgetragen.

Tab. 12: Reaktion der gereinigten Antiseren mit rohen bzw. gebratenen Rindfleischproben mit unterschiedlicher Verweilzeit im Mageninhalt Lebender

Antiserum (1:1000)	Proben			
	1	2	3	4
	Rind	Rind	Rind	Rind
	roh	gebraten	roh	gebraten
	15 min	15 min	30 min	30 min
Anti-Rind				
80 °C-Serum	+	+	+	+
(Abb. 16)				
Anti-Rind				
134 °C-Serum	+	+	+	+

	5	6	7	8
Rind	Rind	Rind	Rind	Rind
roh	gebraten	roh	gebraten	
45 min	45 min	60 min	60 min	
Anti-Rind				
80 °C-Serum	+	-	+	-
(Abb. 16)				
Anti-Rind				
134 °C-Serum	+	-	+	-

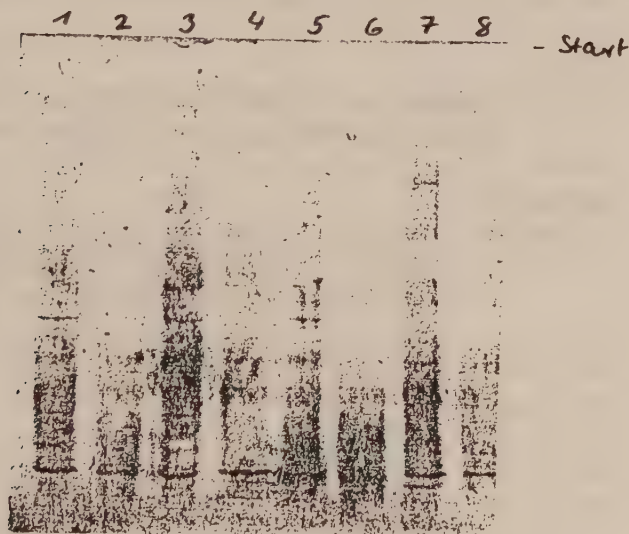


Abb. 16: Reaktion des gereinigten Anti-Rind 80 °C-Serums mit rohen und gebratenen Rindfleischproben mit verschieden langer Verweilzeit im Magen Lebender (siehe Tab. 12)
(Blot von PAG mit linearem Gradienten von 2 - 18 %)

3.4.6 Proben aus dem Mageninhalt Verstorbener

Weder bei bekannten Proben mit bekannter Verweildauer im Magen noch bei unbekannten Proben konnte eine Aussage über die tierartliche Herkunft des betreffenden Fleisches gemacht werden.

Die kürzeste Verweildauer im Magen der untersuchten bekannten Proben war 16 Stunden, die längste vermutlich mehrere Wochen.

Lediglich in einem Falle, bei dem ein Stück roh geräucherter Schweinebauch noch im Ösophagus steckte, war ein Nachweis der tierartlichen Herkunft möglich. Dieses Fleisch hatte aber keinen Kontakt zum Magensaft und ist daher lediglich als Kontrolle geeignet.

Tab. 13: Reaktion gereinigter Antiseren mit Fleischproben aus dem Mageninhalt Verstorbener

Antiserum (1:1000)	Proben				
	1	2	3	4	5
	Kalb	Schwein	Kalb	Schwein	Bolus
	16 Std.	?	2 Tage	1 Tag	Schwein roh
Anti-Rind					
80 °C-Serum	-	-	-	-	-
Anti-Rind					
134 °C-Serum	-	-	-	-	-
Anti-Schwein					
80 °C-Serum	-	-	-	-	+
Anti-Schwein					
134 °C-Serum	-	-	-	-	+
(Abb. 17)					

	6	7	8	9
	Rind	Rind	Rind	Schwein
	?	?	?	?
Anti-Rind				
80 °C-Serum	-	-	-	-
Anti-Rind				
134 °C-Serum	-	-	-	-
Anti-Schwein				
80 °C-Serum	-	-	-	-
Anti-Schwein				
134 °C-Serum	-	-	-	-
(Abb. 17)				

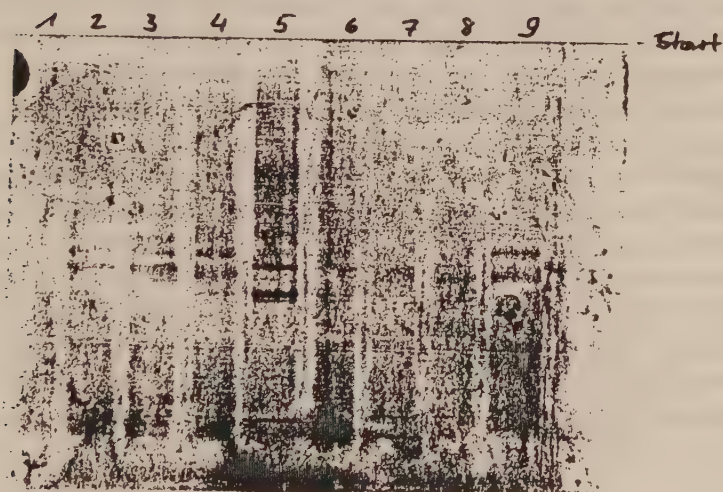


Abb. 17: Reaktion des gereinigten Anti-Schwein
134 °C-Serums mit bekannten und unbekannten
Fleischproben aus dem Mageninhalt Verstorbener
(siehe Tab. 13)
(Blot von PAG mit linearem Gradienten von 2 - 18%)

4 Diskussion

Beim Nachweis der tierartlichen Herkunft von Säugetier-, Geflügel- und Fischfleisch bzw. Fleischprodukten wurden bislang entweder elektrophoretische oder serologische Methoden angewendet.

In dieser Arbeit wurde nicht ausschließlich auf PAG-Elektrophorese zurückgegriffen, da diese Methode sich zwar als geeignet für den Nachweis von nativem tierischen Protein erwiesen hat (TAO, 1985; PARISI und AGUIARI, 1985; VIZZANI et al., 1985; HOFMANN und BLÜCHEL, 1986), nicht aber für den Nachweis von denaturiertem tierischen Protein.

BAUER und HOFMANN (1987) hatten zwar eine Unterscheidung hitzedenaturierten Fleisches anhand der elektrophoretisch aufgetrennten Myoglobinemuster beschrieben, dabei lag die Erhitzungstemperatur aber bei maximal 100 °C. Bei der vorliegenden Arbeit lag Interesse aber vor allem an höheren Erhitzungstemperaturen, wie sie z. B. bei der Verarbeitung von Fleisch im Schnellkochtopf oder bei Vollkonserven auf tierisches Protein einwirken.

SCHRÖTER (1985), der sich ebenfalls mit der Problematik des Nachweises von denaturiertem tierischen Protein und von Fleischproben aus dem Mageninhalt Verstorbener beschäftigt hatte, konnte mit PAG-Elektrophorese lediglich Geflügel- von Säugetierfleisch unterscheiden. Eine nähere Differenzierung des Säugetierfleisches war auf Grund des sehr ähnlichen Bandenmusters nicht möglich. Wegen der Verzehrsgewohnheiten ist aber gerade eine Unter-

scheidung des Fleisches einzelner Säugetierarten, vor allem von Rind- und Schweinefleisch, für Lebensmittelanalytik und Rechtsmedizin sehr wichtig. Auch gegen die ausschließliche Anwendung der IEF sprachen mehrere Gründe. Sie war eigentlich ebenfalls nur für den tierartspezifischen Nachweis bei rohem Fleisch geeignet (KAISER et al., 1980; KAISER et al., 1982; MOUSTAFA et al., 1982; PARISI und AGUIARI, 1985; GRUNDHÖFER, 1985). Zwar behauptet DLABKA (1985), mit Hilfe einer an die IEF anschließenden Silberfärbung die Tierart auch bei hitzesterilisiertem Fleisch nachweisen zu können. Diese Fleischproben wurden aber ausschließlich zu Versuchszwecken, ohne Zusatz von Salz, Gewürzen oder anderen Stoffen hergestellt, weshalb die Ergebnisse dieser Experimente wenig Aussagekraft besitzen. Entscheidend für diese Arbeit war besonders der Nachweis von Fleischprodukten, wie sie im Handel erhältlich sind bzw. vom Verbraucher verzehrt werden. KING (1984) verwendete für seine Versuche zwar handelsübliche Fleischprodukte, konnte mit IEF auf Grund der Banden des Enzyms Adenylatkinase die Tierart bei Fleisch aber nur bis zu Erhitzungstemperaturen von 120 °C identifizieren. Diese Temperatur wird bei zahlreichen Verarbeitungsprozessen überschritten; deshalb mußte nach einer anderen Nachweismethode gesucht werden. Ein weiterer Gesichtspunkt, der gegen die alleinige Anwendung von PAG-Elektrophorese oder IEF sprach, war die Tatsache, daß durch die oft geringen und undeutlichen Unterschiede im Bandenmuster des Fleisches verschiedener Tierarten die Gefahr subjektiver Interpretationen besteht. Um Beweiskraft in der Lebensmittelanalytik und der Rechtsmedizin zu erhalten, müssen Ergebnisse aber eindeutig sein. Selbst JONES und MORTIMER (1985), die nach eigenen Angaben IEF erfolgreich beim Nachweis erhitzten

Fleisches angewandt hatten, bevorzugen in diesem Zusammenhang die serologischen Methoden.

Die gaschromatographische Ermittlung der Fettzusammensetzung nach VERBEKE und DE BRABANDER (1985), die damit eine Tierartidentifizierung bei erhitztem Material erfolgreich durchgeführt hatten, schied für diese Arbeit von vorneherein aus, da die erforderlichen Geräte nicht zur Verfügung standen und die Kosten dieser Nachweismethode eine routinemäßige Anwendung ausschlossen.

Bislang angewandte, ausschließlich serologische Methoden wie AGID oder Immunelektrophorese wurden zwar auch für den Nachweis von hitzedenaturiertem tierischen Protein eingesetzt (MILGROM und WITEBSKY, 1962; MILGROM et al., 1963; SHULMAN et al., 1964; MILGROM et al., 1964; HAYDEN, 1981; KANG'ETHE et al., 1985), erwiesen sich aber ebenfalls wegen des erheblichen Zeitaufwandes, des Bedarfs großer Mengen von Antiserum sowie zum Teil unklarer Ergebnisse als nicht zufriedenstellend. Deshalb konnten herkömmliche serologische Methoden nicht ohne Modifizierung für diese Arbeit übernommen werden.

Bei allen serologischen Methoden ist die Wahl oder Herstellung des spezifischen Antiserums entscheidend. Für die Untersuchung erhitzten tierischen Proteins stehen keine käuflichen Antiseren zur Verfügung, weshalb Antiseren gegen erhitztes Fleisch selbst hergestellt wurden.

Dabei wurden Antikörper gegen das Proteingemisch erzeugt, das aus erhitztem Muskelfleisch extrahiert worden war, da Antiseren gegen einzelne Blut- oder Muskelproteine sich nach Angaben verschiedener Autoren für den tierartlichen Nachweis bei hoch erhitztem Fleisch nicht eignen. HAYDEN (1979) beschreibt in diesem Zusammenhang den Nachweis von Schaf-, Schweine- und Pferdefleisch in Rind-

fleischprodukten mit gegen das Myoglobin dieser Spezies gerichteten Antiseren, wobei die Erhitzungstemperatur aber 70 °C nicht überschritt. Ebenfalls nur bis zu dieser Temperatur zeigte das von KARPAS et al. (1970) hergestellte, gegen IgG gerichtete Antiserum ein positives Ergebnis. Nach WIJNGAARDS und VAN BIERST (1985) reagierten die von ihnen hergestellten Antikörper gegen Blutproteine nur mit nativen Fleischproben.

Das Protein für die Produktion der Antiseren wurde bei eigenen Versuchen wegen des bereits beschriebenen positiven Einflusses auf denaturiertes Eiweiß (SINELL und MENTZ, 1969) mit Harnstoff extrahiert.

Die selbst hergestellten Antiseren zeigten untereinander deutliche Kreuzreaktionen, was in der Literatur auch von KARPAS et al. (1970), DOBERSTEIN und GREUEL (1985) und KANG'ETHE et al. (1985) beschrieben wird.

KANG'ETHE et al. (1985) sowie DOBERSTEIN und GREUEL (1985) führten die Eliminierung der kreuzreagierenden Antikörper durch Absorption der Antiseren mit Serum der kreuzreagierenden Tierarten durch. KARPAS (1970) beschreibt die Absorption mit gereinigtem, heterologen IgG-Präzipitat. Voraussetzung für beide Methoden ist eine größere Menge an Antiserum, wie sie bei eigenen Versuchen nicht zur Verfügung stand. Auf Grund der geringen Menge an vorhandenem Antiserum wurde hier eine Reinigung durch Affinitätschromatographie vorgezogen, wie sie auch von RING et al. (1987) beschrieben wird, die diese Methode bei der Spezifitätsverbesserung von Anti-Sojaprotein-Serum anwendeten.

Im Gegensatz zu diesen Autoren, die die Antikörper gegen Sojaprotein mit Hilfe der stationären Phase herausfilterten und so ihr gereinigtes Antiserum erhielten, wurden in vorliegender Arbeit die kreuzreagierenden Antikörper gebunden, eluiert und verworfen. Diese Methode ist zwar zeit- und materialaufwendiger, ein Versuch hatte aber gezeigt, daß mit dem Verfahren von RING et al. (1987) die Menge der gewonnenen, spezifischen Antikörper sehr gering war. KARPAS (1970) erwähnt bereits die Gefahr, daß ein Antiserum durch Absorption eine zu niedrige Menge an spezifischen Antikörpern enthält und somit unbrauchbar wird.

Die Antiseren gegen Rind-, Schweine-, Puten- und Seelachsfleisch, die alle von Mäusen stammten, reagierten in der Immunfärbung unterschiedlich stark. Die gegen Rind- und Schweinefleisch gerichteten Antiseren zeigten in der Enzymfärbung eine deutlich schwächere Farbreaktion, was auf eine niedrigere Antikörperkonzentration oder eine geringere Affinität zum Antigen schließen läßt.

Die Antiseren gegen Puten- und Seelachsfleisch bewirkten zwar eine deutlich stärkere Farbreaktion bei der Immunfärbung, waren aber nicht gegen die einzelnen Spezies, sondern gegen die Klasse "Aves" bzw. den Stamm "Pisces" gerichtet.

Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung von KANG'ETHE et al. überein, nach der die Antiseren, die von nah verwandten Tierarten stammen, die stärkste Speziespezifität besitzen.

Rind und Schwein gehören wie die Maus der Klasse "Mammalia" an und haben daher einen höheren Verwandtschaftsgrad zur Maus als Vögel und Fische. Damit läßt sich die Tatsache erklären, daß mit Mäuse-Antiserum Rindfleisch von Schweinefleisch und somit Fleisch einzelner Säugetierspezies unterschieden

werden konnte, während dies bei Geflügel- und Fischfleisch unmöglich war.

Noch günstiger für die Herstellung von Antiseren gegen Rind- und Schweinefleisch wären Tiere, die zu diesen Spezies noch näher verwandt sind als Mäuse. Andererseits muß erwähnt werden, daß es mit Mäuse-Antiserum gegen Seelachsfleisch gelingt, auch auf 121 °C erhitztes Fischfleisch nachzuweisen. Im Versuch mit Standardproben gelang auch der Nachweis von Seelachsfleisch, das 20 min auf 134 °C erhitzt worden war, wobei das Fischfleisch allerdings keine Zusätze enthielt.

Bei Rind- und Schweinefleisch liegt die Temperaturgrenze für die Identifizierung zwischen 110 und 120 °C und bei Putenfleisch bei 120 °C. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Maus gegen denaturiertes Protein von Vögeln und Fischen Antikörper produziert, deren Grenze für die Identifizierung bei einer höheren Temperatur liegt als die der Mäuse-Antikörper gegen erhitztes Rind- und Schweinefleisch.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß nicht nur die Art der Herstellung des Antiserums, sondern auch die Wahl des Serumtieres für die Ergebnisse entscheidend ist.

Gekochtes Fleisch, das sich für maximal 60 min im Magen befunden hatte, konnte zumindest zum Teil identifiziert werden, während Fleisch aus dem Mageninhalt Verstorbener, das eine wesentlich längere Verweilzeit im Magen aufwies, in keinem Fall identifiziert werden konnte. Das legt den Schluß nahe, daß die Magensäure das Protein so veränderte, daß es von den Antikörpern gegen erhitztes Fleisch nicht mehr erkannt wurde.

Es wäre aber andererseits nicht sinnvoll, Tiere mit Extrakt von Fleisch aus dem Mageninhalt Verstorbener zu immunisieren, da die Lagerzeit der Leichen und somit die Verweildauer des Mageninhalts in der Magensäure höchst unterschiedlich ist. Deshalb handelt es sich bei dem Probengut um ein sehr uneinheitliches Material, gegen das wohl kaum pauschal Antikörper erzeugt werden können.

Die in dieser Arbeit angewendete Methode stellt eine Kombination von elektrophoretischen und serologischen Verfahren dar. Ihre Vorteile liegen in dem geringen Verbrauch an Antiserum und der höheren Sensibilität im Vergleich zu herkömmlichen Methoden.

Die neue Methode des Dot-Blottings vereinigt diese Vorteile mit geringeren Kosten und weniger Arbeitsaufwand. Es sollte allerdings wegen des gleichmäßigeren Probenauftrags auf Dot-Blotting-Geräte zurückgegriffen werden. Das Dot-Blotting hat durchaus Chancen, im weiteren Verlauf andere Routinemethoden wie die Agargel-Immunodiffusion abzulösen.

Eine Verbesserung der Tierartidentifizierung bei hocherhitztem Fleisch läßt sich möglicherweise erzielen durch Antiseren gegen hitzestabile Antigene aus Nebennieren, die auch in Organen und Skelettmuskulatur vorkommen (MILGROM und WITEBSKY, 1962; MILGROM et al., 1963; SHULMAN et al., 1964; MILGROM et al., 1964; HAYDEN, 1979; KANG'ETHE et al., 1985).

Eine Alternative wäre nach JONES (1985) auch die Produktion monoklonaler Antikörper gegen erhitztes tierisches Protein nach der Methode von KÜHLER und MILSTEIN (1975). PORALLA et al. (1984) haben monoklonale Antikörper bereits bei nativem Material erprobt.

5 Zusammenfassung

Die tierartspezifische Identifizierung von denaturiertem tierischen Protein bereitet in der Lebensmittelanalytik und in der Rechtsmedizin erhebliche Probleme.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, die Identifizierung solchen Proteins zu verbessern.

Zu diesem Zweck wurde ein elektrophoretisches mit einem serologischen Verfahren kombiniert. Zunächst wurde das Protein elektrophoretisch aufgetrennt und mit Elektroblothing auf Nitrozellulosefolie übertragen.

Alternativ dazu wurde der Probenextrakt beim Dot-Blotting direkt auf die Nitrozellulosefolie übertragen.

Nach Inkubation mit einem von Mäusen gewonnenen tierartspezifischen Antiserum erfolgte die Enzymfärbung.

Untersucht wurde unterschiedlich hoch erhitztes Rind-, Schweine-, Geflügel- und Fischfleisch sowie Fleisch aus dem Mageninhalt von Lebenden und Verstorbenen.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Die Höhe der Temperatur, bis zu der erhitzte Proben noch identifiziert werden konnten, war bei Antiseren gegen auf 80 °C und bei Antiseren gegen auf 134 °C erhitztes Fleisch tierartspezifisch gleich.

Die Antiseren gegen Putenfleisch reagierten auch mit anderen Geflügelfleischarten.

Antiseren gegen Seelachsfleisch reagierten mit Fleisch von allen untersuchten Süßwasser- und Seefischarten.

Dagegen waren die Seren gegen Rind- und Schweinefleisch relativ tierartspezifisch.

Bei erhitztem Rind- und Schweinefleisch lag die Temperaturgrenze, bei der die Tierart noch identifiziert werden konnte, zwischen 110 und 120 °C und bei Geflügelfleisch bei 120 °C.

Seelachsfleisch konnte bei einer Versuchscharge auch nach 20-minütigem Erhitzen auf 134 °C noch identifiziert werden.

Im Mageninhalt von Lebenden enthaltenes Fleisch ließ sich nach einer maximalen Verweilzeit von 60 Minuten im Magen in manchen Fällen tierartlich einordnen. Beim Mageninhalt von Verstorbenen war dies generell nicht möglich.

Improvement of the Methods for the Species Specific
Detection of Denatured Animal Protein

The species-specific identification of denatured animal protein creates essential problems in food analysis and forensic medicine.

Therefore this thesis is a try to improve the identification of such protein.

For this purpose electrophoretic and serologic methods have been combined.

First the proteins have been separated electrophoretically and transferred to a nitrocellulose sheet by electroblotting. Alternatively the sample extract has directly been laid on the nitrocellulose sheet at the dot-blotting.

After incubation with species specific antiserum produced in mice the enzyme staining was carried out. Tests have been carried out with beef, pork, poultry- and fish meat heated to different temperatures and with stomach contents of living and deceased.

Following results have been obtained:

The height of the temperature up to which heated samples could be identified was speciesspecifically the same for antiserum against meat heated to 80 °C as well as for antiserum against meat heated to 134 °C.

Antisera against turkey meat also reacted with other poultry meat.

Antisera against saithe meat reacted with every other freshwater- and seafish meat tested.

On the other hand sera against beef and pork were relatively species specific.

For heated beef and pork the temperature limit up to which the species still could be identified, was between 110 and 120 °C and for poultry meat at 120 °C.

Saithe meat of one test charge could still be identified after heating for 20 minutes at 134 °C.

Meat from stomach contents of living persons could in some cases be attributed to animal species after having been in the stomach for a maximum of 60 minutes.

Using the applied method stomach contents of deceased could not be attributed to any of the species examined.

7 Literaturverzeichnis

Axén, R., Porath, J. and Ernback, S.:

Chemical Coupling of Peptides and Proteins
to Polysaccharides by Means of Cyanogen
Halides.

Nature 214 (1967), 1302

Bauer, F. und Hofmann, K.:

Elektrophoretische Tierartbestimmung.
Steigerung der Empfindlichkeit durch
Peroxidasefärbung der Myoglobine.
Fleischwirtschaft 67 (1987), 861

Beisiegel, U.:

Protein Blotting.
Electrophoresis 7 (1986), 1

Belitz, H.-D. und Grosch, W.:

Lehrbuch der Lebensmittelchemie.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1982,
7

Blix, G., Felix, K., Grassmann, W., Trupke, J.,

Ackermann, D. und Schneider, F.:

V. Eiweißstoffe und ihre Abbaustufen.

In: Flaschenträger, B. und Lehnartz, E. (Hrsg.):

Physiologische Chemie, Bd. I. Die Stoffe.

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1951,
484

Bendall, J. K.:

Post-Mortem Changes in Muscle.

In: Bourne, G. H. (ed.):

The Structure and Function of Muscle, Vol. II.

Structure Part 2.

2nd Edition.

Acad. Press, New York and London 1973, 243

Burnette, W. N.:

"Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A.

Anal. Biochem. 112 (1981), 195

Colvin, J. R.:

Denaturation a Requiem.

In: Schulz, H. W. and Anglemier, A. F.
(eds.):

Proteins and Their Reactions.

AVI Publishing Co. Inc., Westport, Conn. 1964,
69

Coons, A. H. and Kaplan, M. H.:

Localization of Antigen in Tissue Cells.

II. Improvements in a Method for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent Antibody.

J. Exp. Med. 91 (1950), 1

Cooper, M. G.:

Meat Species Testing in Australia.

In: Patterson, R. L. S. (ed.):

Biochemical Identification of Meat Species.

Elsevier Appl. Sci. Publ., London and
New York 1985, 80

Cooper, T. G.:

Biochemische Arbeitsmethoden.

Übersetzt und bearbeitet von R. Neumeier und H. R.
Maurer.

Walter de Gruyter Verlag, Berlin-New York 1981

Daum, V.:

Zum quantitativen serologischen Nachweis von
Blutplasma in Roh- und Brühwürsten.

Diss. med. vet., München 1984

Davenport, H. W.:

Physiology of the Digestive Tract.

5th Edition.

Year Book Medical Publ. Inc., Chicago, London
1982

Dlabka, A.:

Tierartendifferenzierung aus hitzesterilisier-
tem Fleisch mittels Isoelektrofokussierung
und anschließender Silberfärbung.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 98 (1985),
130

Doberstein K. H. and Greuel, E.:

Identification of Meat of African Antelope
Species and Kangaroo by the Agar Gel Preci-
pitation Test.

In: Patterson, R. L. S. (ed.):

Biochemical Identification of Meat Species.
Elsevier Appl. Sci. Publ., London and
New York 1985, 65

Elkon, K. B.:

Isoelectric Focusing of Human IgA and Secre-
tory Proteins Using Thin Layer Agarose Gels
and Nitrocellulose Capillary Blotting.

J. Immunol. Methods 66 (1984), 313

Engelhardt, V. A.:

Adenosine Triphosphatase Properties of
Myosin.

Adv. Enzymol. 6 (1946), 158

Erickson, P. F., Minier, L. N. and Lasher, R. S.:
Quantitative Electrophoretic Transfer of Poly-
peptides from SDS Polyacrylamide Gels to
Nitrocellulose Sheets: A Method for Their
Re-Use in Immunoautoradiographic Detection
of Antigens.

J. Immunol. Methods 51 (1982), 241

Erlich, H. A., Levinson, J. R., Cohen, S. N. and
Mc Devitt, H. O.:

Filter Affinity Transfer.

A New Technique for the In Situ Identifica-
tion of Proteins in Gels.

J. Biol. Chem. 254 (1979), 12240

Freifelder, D.:

Physical Biochemistry.

Applications to Biochemistry and Molecular
Biology.

W. H. Freeman and Co., San Francisco 1976

Fruton, J. S.:

Pepsin.

In: Boyer, P. D. (ed.):

The Enzymes.

Vol. III: Hydrolysis: Peptide Bonds.

3rd Edition.

Acad. Press, New York and London 1971, 119

Gershoni, J. M. and Palade, G. E.:

Electrophoretic Transfer of Proteins from
Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels
to a Positively Charged Membrane Filter.

Anal. Biochem. 124 (1982), 396

Gershoni J. M. and Palade, G. E.:

Review: Protein Blotting: Principles and
Applications.

Anal. Biochem. 131 (1983), 1

Glazer, A. N., De Lange, R. J. and Sigman, D. S.:
Chemical Modification of Proteins, Selected
Methods and Analytical Procedures.
North-Holland Publ., Amsterdam 1975, 68

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Gianazza E.,
and Rhigetti, P. G.:
J. Biochem. Biophys. Methods 3 (1980), 273

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Gianazza, E.,
and Rhigetti, P. G.:
In: Allen, R. G. and Arnaud, P. (eds.):
Electrophoresis '81
Walter de Gruyter Verlag, Berlin-New York 1981,
257

Grabar, P. et Williams, C. A.:
Méthode permettant l'étude conjuguée des
propriétés électrophorétiques et immuno-
chimiques d'un mélange de protéines.
Applications au sérum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta 10 (1953), 193

Grundhöfer, F.:
Ultrathin-Layer Isoelectric-Focusing in Mini-
Gels: A Rapid Method for the Species Identi-
fication of Raw Meat and Meat-Products.
In: Patterson, R. L. S. (ed.):
Biochemical Identification of Meat Species.
Elsevier Appl. Sci. Publ., London and
New York 1985, 37

Hamm, R.:
Heating of Muscle Systems.
In: Briskey, E. J., Cassens, R. G.
and Trautmann, J. C. (eds.):
The Physiology and Biochemistry of Muscle
as a Food.
University of Wisconsin Press, Madison and
New York 1966, 363

Hancock, K. and Tsang, V. C. W.:

India Ink Staining of Proteins on Nitrocellulose Paper.

Anal. Biochem. 133 (1983), 157

Hashimoto, Y., Fukazawa, T., Niki, R., Kanazawa, H. and Yasui, T.:

Denaturation of Myosin A.

Jap. J. Zootech. Sci. 30 (1959), 318

Haurowitz, F.:

Eiweißdenaturierung.

In: Hoppe-Seyler, F. und Thierfelder, H. (Hrsg.):

Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse für Ärzte, Biologen und Chemiker, Bd. IV, 1.: Bausteine des Tierkörpers. II.

10. Auflage.

Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg
1960, 116

Hayden, A. R.:

Immunochemical Detection of Ovine, Porcine and Equine Flesh in Beef Products with Antisera to Species Myoglobin.

J. Food Sci. 44 (1979), 494

Hayden, A. R.:

Use of Antisera to Heat-Stable Antigens of Adrenals for Species Identification in Thoroughly Cooked Beef Sausages.

J. Food Sci. 46 (1981), 1810

Heimann, W.:

Grundzüge der Lebensmittelchemie.

3. Auflage.

Steinkopff Verlag, Darmstadt 1976, 35

Hellmannsberger, L.:

Routinenachweis von Fremdeiweißen in erhitzten Fleisch-Erzeugnissen mittels Polyacrylamid-Gel-(Disk-)Elektrophorese.

Diss. med. vet., München 1981

Hofmann, K.:

The Influence of Heat on Meat Proteins Studied by SDS-Electrophoresis.

In: Hoyem, T. and Kvåle, S. (eds.):

Physical and Biological Changes in Food Caused by Thermal Processing.

Elsevier Appl. Sci. Publ., London and New York 1977, 311

Hofmann, K.:

Charakterisierung der Proteine in Muskeln und inneren Organen von Rind und Schwein mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. 24. Europ. Fleischforscher-Kongreß, Vol. III, Kulmbach 1978, L. 2:3

Hofmann, K.:

Principal Problems in the Identification of Meat Species of Slaughter Animals Using Electrophoretic Methods.

In: Patterson, R. L. S. (ed.):

Biochemical Identification of Meat Species.

Elsevier Appl. Sci. Publ., London and New York 1985, 9

Hofmann, K. und Blüchel, E.:

Bestimmung der Tierart von rohem Muskelfleisch anhand der Myoglobinmuster im pH-Gradienten-Gel.

Fleischwirtschaft 66 (1986), 916

Hofmann, K. und Penny, J. F.:

Eine Methode zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Fleisch- und Fremdeiweiß mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Flachgelen.

Fleischwirtschaft 53 (1973), 252

Hvass, A.:

Species Differentiation of Minced Meat Products by Immunodiffusion.

In: Patterson, R. L. S. (ed.):

Biochemical Identification of Meat Species.

Elsevier Appl. Sci. Publ., London and

New York 1985, 53

Jaenicke, R.:

Wärmeaggregation und Wärmebehandlung von Proteinen.

Dechema Monographien 56 (1965), 207

Janssen, F. W., Voortman, G. and de Baaij, J. A.:

Detection of Soya Proteins in Heated Meat Products by "Blotting" and "Dot Blot".

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 182 (1986), 479

Johnson, T. K., Yuen, K. C. L., Denell, R. E. and

Consigli, R. A.:

Efficient Transfer of Proteins from Acetic Acid-Urea and Isoelectric Focusing Gels to Nitrocellulose Membrane Filters with Retention of Protein Antigenicity.

Anal. Biochem. 133 (1983), 126

Johnston, R. W.:

An Over-Night Rapid Beef Identification Test (ORBIT).

In: Patterson, R. L. S. (ed.):

Biochemical Identification of Meat Species.

Elsevier Appl. Sci. Publ., London and

Jones, S. J.:

Recent Improvements in Existing Techniques
and New Approaches to Species Identification.
In: Patterson, R. L. S. (ed.):
Biochemical Identification of Meat Species.
Elsevier Appl. Sci. Publ., London and
New York 1985, 193

Jones, S. J. and Mortimer, R. H.:

Species Identification of Cooked Meats by
Isoelectrofocusing. Preliminary Studies to
Resolve Heat-Stable Components Isolated from
Adrenal and Muscle Tissue.
In: Patterson, R. L. S. (ed.):
Biochemical Identification of Meat Species.
Elsevier Appl. Sci. Publ., London and
New York 1985, 118

Kaiser K.-P., Matheis, G., Kmita-Dürmann, C. und
Belitz, H.-D.:

Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen
Methoden bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten
Produkten. II. Qualitative und quantitative
Analyse roher binärer Fleischmischungen durch
isoelektrische Focussierung in Polyacrylamidgel.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 171 (1980), 415

Kaiser, K.-P., Matheis, G., Schweiger-Recknagel, D.
und Belitz, H.-D.:

Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen
Methoden bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten
Produkten. IV. Untersuchungen von rohem Wurstbrät
und Innereien durch isoelektrisches Focussieren
in Polyacrylamidgel unter Verwendung von Fertig-
platten und selbstgegossenen Platten.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174 (1982), 13

- Kang'ethe, E., Lindqvist, K. J. and Gathuma, J. M.:
Immunological Reactions of Thermostable Muscle
Antigens and Their Possible Use in Speciation
of Cooked and Fresh Animal Meats.
In: Patterson, R. L. S. (ed.):
Biochemical Identification of Meat Species.
Elsevier Appl. Sci. Publ., London and
New York 1985, 129
- Karcher, D. Lowenthal, A., Thormar, H. and Noppe, M.:
Serologic Identification of Viral Antigens
After Electrophoretic Transfer.
J. Immunol. Methods 43 (1981), 175
- Karpas, A. B., Myers, W. L. and Segre, D.:
Serologic Identification of Species of
Origin of Sausage Meats.
J. Food Sci. 35 (1970), 150
- Karlson, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
11. Auflage.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1980
- Kauzmann, W.:
Structural Factors in Protein Denaturation.
J. Cell. Comp. Physiol. 47 (suppl.) (1956),
13
- King, N. L.:
Species Identification of Cooked Meats by
Enzyme-Staining of Isoelectrofocusing Gels.
Meat Sci. 11 (1984), 59

Köhler, G. und Milstein, C.:

Continuous Cultures of Fused Cells Secreting
Antibody of Predefined Specificity.
Nature 256 (1975), 495

Lowry, o. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and
Randall, R. J.:

Protein Measurement with the Folin Phenol
Reagent.

J. Biol. Chem. 193 (1951), 265

Luyet, B. J.:

Behaviour of Muscle Subjected to
Freezing and Thawing.

In: Briskey, E. J., Cassens, R. G. and
Trautmann, J. C.:

The Physiology and Biochemistry of Muscle
as a Food.

University of Wisconsin Press, Madison and London
1966, 353

Magee, D. F.:

Pepsin.

In: The Medical Clinics of North America.

Vol 58, 6.

Symposium on Gastrointestinal Physiology.

W. B. Saunders Company, Philadelphia-London-
Toronto 1974, 1277

Magee, D. F. and Dalley, A. F.:

Digestion and the Structure and Function of
the Gut.

Karger Continuing Education Series, Basel
1986, 89

Manz, J.:

Nachweis hitzedenaturierter Muskelproteine
mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
Fleischwirtschaft 63 (1983), 1767

Maurer, H. R.:

Disc Electrophoresis and Related Techniques
of Polyacrylamidegel-Electrophoresis.
2nd Edition.
Walter de Gruyter Verlag, Berlin-New York
1971

Merkel, H.:

Über Mageninhalt und Todeszeit.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 1 (1922), 346

Milgrom, F. and Witebsky, E.:

Immunological Studies on Adrenal Glands.
I. Immunization with Adrenals of Foreign
Species.
Immunol. 5 (1962), 46

Milgrom, F., Tuggac, M. and Witebsky, E.:

Immunological Studies on Adrenal Glands.
III Interspecies Relations of Thermostable
Adrenal-Specific Antigens.
Immunol. 6 (1963), 105

Milgrom, F., Tuggac, M. and Witebsky, E.:

Studies on Species Specificity.
J. Immunol. 93 (1964), 902

Moustafa, E. K., Stegemann, H. und Antonacopoulos, N.:

Elektrophoretische Differenzierung hitzede-
naturierter und eisgelagerter Fischproteine.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 175 (1982), 199

Nanninga, L. B.:

The Effect of Heat on the Kinetic Constants
of Myosin Adenosine Triphosphatase.

Nature 194 (1962), 187

Neurath, H., Greenstein, J. P., Putnam, F. W. and
Erickson, J. O.:

The Chemistry of Protein Denaturation.

Chem. Rev. 34 (1944), 157

Nielsen, P. J., Manchester, K. L., Towbin, H.,
Gordon, J. and Thomas, G.:

The Phosphorylation of Ribosomal Protein S6
in Rat Tissues Following Cycloheximide Injec-
tion in Diabetes and after Denervation of
Diaphragm.

A Simple Immunological Determination of the
Extent of S6 Phosphorylation on Protein Blots.

J. Biol. Chem. 257 (1982), 12316

N. N.:

Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse.

Leitsätze für Fische, Krusten-, Schalen- und
Weichtiere und Erzeugnisse daraus.

Deutsches Lebensmittelbuch.

Leitsätze.

Ausgabe 1982.

Herausgegeben vom Bundesminister für Jugend,
Familie und Gesundheit, 5300 Bonn 2

N. N.:

Fleischhygienegesetz (FlHG) vom 24. Februar 1987

BGBL. I (1987), 649

Ohlenschläger, Berger und Depner:

Synopsis der Elektrophoresetechniken.

G-I-T Verlag Ernst Giebeler, Darmstadt 1980,

73

Ouchterlony, Ü.:

Diffusion in Gel-Methods for Immunological
Analysis. I.

Progr. Allergy 5 (1958), 1

Ouchterlony, Ü.:

Diffusion in Gel-Methods for Immunological
Analysis. II.

Progr. Allergy 6 (1962), 30

Parisi, E. and Aguiari, D.:

Methods of Differentiating Meats of Different
Species of Animals.

In: Patterson, R. L. S. (ed.):

Biochemical Identification of Meat Species.

Elsevier Appl. Sci. Publ., London

and New York 1985, 40

Peters, J. H., Baumgarten, H. und Schulze, M.:

Monoklonale Antikörper:

Herstellung und Charakterisierung.

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-

Tokyo 1985

Pfisterer, J.:

Blotting - Eine neue Generation von Nachweis-
verfahren.

Sonderdruck aus:

Bio-Engineering. Forschung und Praxis; Zeit-

schrift für alle Gebiete der Biotechnologie.

2/87, 84

Resch Verlag, Gräfelfing

Pharmacia Fine Chemicals:

Handbook Affinity Chromatography.

Uppsala, 1979

Poralla, T., Dippold, W., Dienes, H. P., Manns, M. and Meyer zum Buschenfelde, K.-H.:

A Monoclonal Antibody Directed Against Organ-Specific Liver Cell Membrane Antigen in Rabbits.

J. Immunol. Methods 68 (1984), 341

Putnam, F. W.:

The Interaction of Proteins and Synthetic Detergents.

Adv. Protein Chem. 4 (1948), 79

Renart, J., Reiser, J. and Stark, G. R.:

Transfer of Proteins from Gels to Diazobenzyl-oxymethyl-Paper and Detection with Antisera: A Method for Studying Antibody Specificity and Antigen Structure.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979), 3116

Ring, Ch., Jennissen, H. P. und Puff, A.:

Affinitätschromatographische Reinigung von Anti-Sojaprotein-Serum.

28. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft.
Garmisch-Partenkirchen 1987, 112

Roider, R.:

Zur Extraktion von Sojaprotein und aufgeschlossenen Milcheiweiß aus erhitzten Fleisch-Erzeugnissen.

Diss. med. vet., München, 1984

Scheunert, A. und Trautmann, A.:

Lehrbuch der Veterinär-Physiologie

8. Auflage.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1987

Schormüller, J.:

Lehrbuch der Lebensmittelchemie.

Zweite vollständig neubearbeitete Auflage.

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-NewYork

1974

Schröter, M.:

Spezifitätsuntersuchung an denaturierten Muskelproteinen mittels SDS-PAG-Elektrophorese.

Diss. med., München 1985

Shapiro, A. L., Vinuela, E. and Maizel, J. Jr.:

Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 (1967), 815

Shulman, S., Milgrom, F. and Witebsky, E.:

Immunological Studies on Adrenal Glands.

IV. Chemical Studies on the Bovine Thermolabile Adrenal-Specific Antigen.

Immunol. 7 (1964). 605

Sinell, H.-J. und Mentz, I.:

Serologische Species-Identifizierung hitzedenaturierter Muskelproteine mittels Harnstoffextraktion.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 82 (1969), 55

Southern, E. M.:

Detection of Specific Sequences Among DNA-Fragments Separated by Gel-Electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98 (1957), 503

Stryer, L.:

Biochemistry.
Third edition.
W. H. Freeman and Co., New York 1988

Svensson, H.:

Isoelectric Fractionation, Analysis and Characterization of Ampholytes in Neutral pH-Gradients.
Acta. Chem. Scand. 15 (1961), 325

Swart, K. S. and Wilks, C. R.:

An Immunodiffusion Method for the Identification of the Species of Origin of Meat Samples.
Aust. Vet. J. 59 (1982), 21

Tao, S.-H.:

Identification of Animal Species by Electrophoresis.
In: Patterson, R. L. S. (ed.):
Biochemical Identification of Meat Species.
Elsevier Appl. Sci. Publ., London and New York 1985, 32

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.:

Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979), 4350

Towbin, H. and Gordon, J.:

Immunoblotting and Dot Immunobinding -
Current Status and Outlook.

J. Immunol. Methods 72 (1984), 314

Trautmann, J. C.:

Role of Muscle Protein in Processed Foods.

In: Briskey, E. C., Cassens, R. G. and
Trautmann, J. C.:

The Physiology and Biochemistry of Muscle as
a Food.

University of Wisconsin Press, Madison and
New York 1966, 403

Tröger, H. D., Baur, C. und Spann, K.-W.:

Mageninhalt und Todeszeitbestimmung.

Methodik und gerichtsmedizinische Bedeutung.

In: Arbeitsmethoden der medizinischen und natur-
wissenschaftlichen Kriminalistik.

Band 16.

Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck 1987

Uhlenhuth, P.:

Die Unterscheidung des Fleisches verschiede-
ner Thiere mit Hilfe spezifischer Sera und
die praktische Anwendung der Methode in der
Fleischschau.

Dt. Med. Wschr. 27 (1901), 780

Verbeke, R. and de Brabander, H.:

Differentiation of Meat Species in Processed Meat Products Through Identification of Animal Fat Species.

In:

Patterson, R. L. S. (ed.):

Biochemical Identification of Meat Species.

Elsevier Appl. Sci. Publ., London and

New York 1985, 145

Vesterberg, O.:

Synthesis and Isoelectric Fractionation of Carrier Ampholytes.

Acta Chem. Scand. 23 (1969), 2653

Vizzani, A., Avellini, P., Severini, M. and Cenci, G.:

The Use of Electrophoretic Techniques for Identifying Raw Wild Boar and Domestic Pig Meat.

In: Patterson, R. L. S. (ed.):

Biochemical Identification of Meat Species.

Elsevier Appl. Sci. Publ., London and New York

1985, 50

Westermeier, R., Postel, W. und Görg, A.:

Elektrophorese, Stand und Trends elektrophoretischer Trennverfahren.

LABO 13 (1982), 1159

Wijngaards, G. and van Biert, M.:

Quantitative Estimation of Meat Species by Immunological Methods. Problems and Improvements.

In: Patterson, R. L. S. (ed.):

Biochemical Identification of Meat Species.

Elsevier Appl. Sci. Publ. Ltd., London and

New York 1985, 90

Herrn Prof. Dr. E. Liebhardt danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. Spann danke ich für die freundliche Aufnahme in das Institut für Rechtsmedizin.

Herrn Prof Dr. Dr. h. c. L. Kotter gilt mein Dank für die kritische Durchsicht der Arbeit sowie seine wertvollen Hinweise.

Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. H. Schmidt und Herrn Dr. H.-J. Klein danke ich für die Durchsicht der Arbeit und die Verbesserungsvorschläge.

Herrn Prof Dr. Dr. h. c. W. Brendel danke ich für die großzügige Aufnahme in das Institut für Chirurgische Forschung am Klinikum Großhadern.

Herrn Prof. Dr. Dr. B.-U. von Specht gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Labor, seine wertvollen Hinweise und nicht zuletzt die materielle Unterstützung.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. C. Baur für ihre fachliche und moralische Unterstützung während des gesamten Verlaufs der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Ursula Schwarz bedanken, die mich nicht nur in die Labormethoden eingeweiht hat, sondern mir stets bei allen Schwierigkeiten mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Ganz besonders herzlich danke ich Herrn Dr. med. Peter Bader, ohne dessen fachliche Hilfe, persönlichen Einsatz und moralische Unterstützung in Krisenzeiten diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Geburtsdatum:	30. September 1961
Geburtsort:	München
Vater:	Walter Wolf, Rentner
Mutter:	Marianne Wolf, geb. Wolf, Behör- denangestellte
1967 - 1971	Grundschule an der Leipziger Straße, München
1971 - 1980	Städt. Louise-Schröder- Gymnasium, München
27. 6. 1980	Hochschulzugangsberechti- gung
1980 - 1985	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig- Maximilians-Universität München
24. 2. 1986	Approbation als Tier- ärztin
Seit Januar 1986	Anfertigung einer Dissertationsarbeit im Fach Rechtsmedizin am Institut für Chirurgische Forschung des Klinikums Großhadern

